

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

par

Albert VILLE

Licencié ès Sciences

Maître-assistant à la Faculté des Sciences

Première Thèse

ETUDE DE LA BIOGENESE DES PIGMENTS FLAVONIQUES
CHEZ QUELQUES ESPECES VEGETALES
A L'AIDE DE MOLECULES MARQUEES AU ^{14}C

Deuxième Thèse

PROPOSITIONS DONNÉES par la FACULTÉ

Soutenues le 6 Juin 1966 devant la Commission d'Examen :

MM. J. COLONGE

Président

J. CHOPIN

H. PACHECO

C. MENTZER

} Membres du Jury

Membre invité

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

par

Albert VILLE

Licencié ès Sciences

Maître-assistant à la Faculté des Sciences

Première Thèse

ETUDE DE LA BIOGENESE DES PIGMENTS FLAVONIQUES
CHEZ QUELQUES ESPECES VEGETALES
A L'AIDE DE MOLECULES MARQUEES AU ^{14}C

Deuxième Thèse

PROPOSITIONS DONNÉES par la FACULTÉ

Soutenues le 6 Juin 1966 devant la Commission d'Examen :

MM. J. COLONGE	Président
J. CHOPIN	{ Membres du Jury
H. PACHECO	
C. MENTZER	Membre invité

UNIVERSITE DE LYON - FACULTE DES SCIENCES

Doyens Honoraires

MM. LONGCHAMBON, MOUSSA, GAUTHIER Henri.

Professeurs Honoraires

MM. de LARAMBERGUE, SOLLAUD, MENTZER, MOUSSA, JAFFARD, EYRAUD Henri, DEJARDIN, VIRET.

Doyen

M. BRACONNIER.

Assesseurs

MM. MESNARD , BOIDIN.

Professeurs

MM. LONGCHAMBON	Minéralogie
PRETTRE	Chimie industrielle
COURTY	Chimie-Physique
KUHNER	Botanique
MALECOT	Mécanique rationnelle et appliquée
PARIS	Chimie minérale
AUMERAS	Chimie générale II
COLONGE	Chimie organique
JANIN	Physique générale
FLANDRIN	Géologie appliquée
BERNARD	Physique industrielle
DUFAY Jean	Astronomie
NIGON	Zoologie expérimentale
GAUTHIER Henri	Géologie générale
WAUTIER	Zoologie
CHOPIN	Chimie biologique
CUEILLERON	Chimie
BRACONNIER	Calcul différentiel et intégral
EYRAUD Charles	Chimie-Physique appliquée
SARAZIN	Physique nucléaire
BOIDIN	Microbiologie et Mycologie
PERES	Physiologie
MESNARD	Electronique
GRANDMONTAGNE	Physique
BOUTILLIER	Minéralogie
LAFOUCRIERE	Physique nucléaire théorique
DREUX	Chimie organique
TEICHER	Chimie industrielle
PAVANS DE CECCATTY	Zoologie
MERLIN	Chimie analytique

Professeurs (suite)

MM. DUFAY Maurice	Physique de l'Atmosphère
PHILBERT	Physique nucléaire
COHEN-ADAD	Chimie
DAVID Louis	Géologie générale
CHANEL	Psychophysiologie
MAURY	Méthodes Mathématiques de la Physique
DEPRAZ	Physique nucléaire
GAUTHIER Jean	Chimie
GAUME	Physique expérimentale
UZAN	Physique S. P. C. N.
LEGAY	Biologie animale.

Professeurs sans chaire

MM. FERON	Mathématiques
LAFORGUE	Physique
CHENEVOY	Géologie appliquée
GINET	Zoologie
ASCH	Physique
MICHEL Pierre	Minéralogie
Mle MAITROT	Physique
MM. GEVIN	Géologie générale
PONASSE	Mathématiques
d'INCAN	Physique C. S. U.
LEFEBVRE	Mathématiques
PERNET	Mathématiques
CHERY	Physique
BERGEON	Physique C. S. U.
Mle GAUTHERON	Chimie biologique
MM. DESCOTES	Chimie organique
ERBEIA	Physique
Mme ERICSON	Physique générale
M. LEMOIGNE	Botanique

Maîtres de Conférences

MM. MARTEL	Mécanique
MATHIEU	Mécanique des Fluides
PICARD Philippe	Mathématiques
DEMARCO	Géologie générale
MICHEL Georges	Biochimie
LEBRETON	Biologie végétale
DAVID Jean	Biologie animale
TOUSSET	Chimie propédeutique
FEUVRAIS	Physique Electricité
SCHMITT	Physique C. P. E. M.
LAURENT	Chimie organique

Maitres de Conférences (suite)

MM.	ROT	Mathématiques
	BETHOUX	Mathématiques T. M. P.
Mle	CALAIS	Mathématiques
M.	GUSAKOW	Physique
Mle	THOMAS	Chimie minérale
MM.	COLOBERT	Physiologie
	AUBIN	Analyse numérique
	BUCHWALTER	Mathématiques
	BOUZON	Mathématiques C. S. U.
	COSNIER	Psychophysiologie
Mle	LAMOURE	Biologie végétale
MM.	PORTHAULT	Chimie C. S. U.
	VALLET	Chimie macromoléculaire

Maître de Conférences adjoint

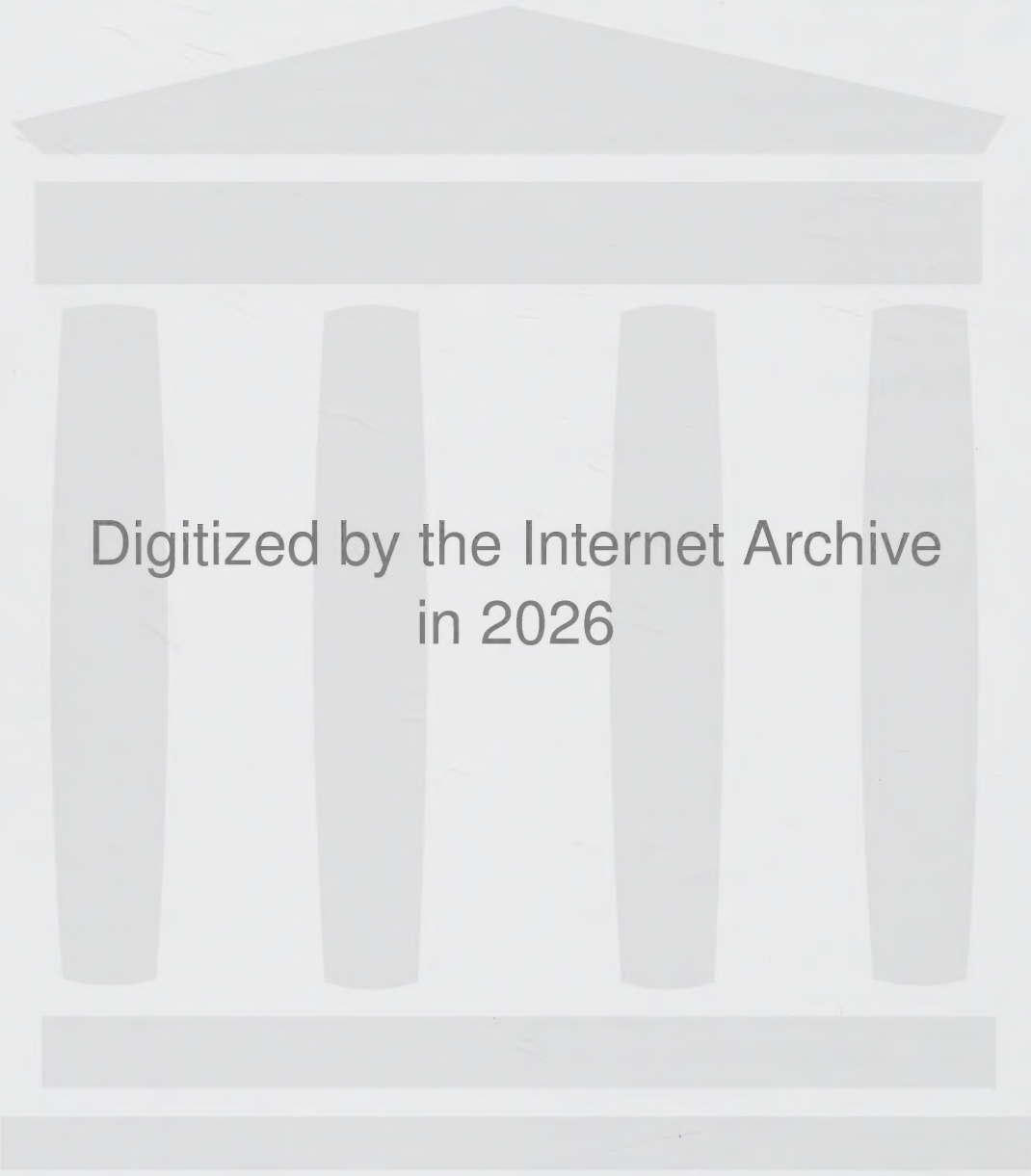
M.	PIERRON	Chimie
----	---------	--------

Conseiller administratif

M.	BURNET
----	--------

Secrétaire Principal honoraire

M.	ROUX
----	------



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552626_0029

- A MONSIEUR H. PACHECO

Professeur à la Faculté des Sciences de LYON
Directeur du Service de Chimie biologique
à l'Institut National des Sciences Appliquées.

Hommage de profond respect et de vive gratitude.

- A MONSIEUR C. MENTZER

Professeur au Laboratoire de Chimie appliquée
aux corps organisés
du Muséum National d'Histoire Naturelle de PARIS.

En faible témoignage pour son enthousiasme et son
esprit créateur dans le domaine de la recherche
scientifique.

- A mon Parrain.

- A ma Femme et à ma Fille.

- A mes amis.

AVANT-PROPOS

Le présent travail a été effectué successivement au Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de LYON, au Laboratoire de Chimie appliquée aux corps organisés du Muséum National d'Histoire Naturelle de PARIS, puis dans le service de Chimie Biologique de l'Institut National des Sciences Appliquées de LYON.

Avant d'exposer ce travail, nous tenons à remercier Monsieur le Professeur H. PACHECO pour la bienveillante sollicitude avec laquelle il a guidé et orienté nos recherches.

Qu'il nous soit permis également d'exprimer à Monsieur le Professeur C. MENTZER notre sincère et respectueuse reconnaissance pour le soutien moral et matériel qu'il nous a donné pendant nos débuts difficiles et pour l'enthousiasme qu'il nous a communiqué dans nos recherches.

Nous adressons aussi nos vifs remerciements à Monsieur le Professeur J. COLONGE qui a bien voulu nous faire l'honneur de présider notre Jury et de juger notre travail.

Que Monsieur le Professeur J. CHOPIN, qui, à maintes reprises, a su nous conseiller trouve ici le témoignage de notre profonde gratitude.

Enfin, nous remercions particulièrement nos Camarades qui ont été, surtout au début de nos travaux, un soutien moral très important et qui n'ont pas ménagé leurs efforts pour nous conseiller.

S O M M A I R E

=====

	page
<u>INTRODUCTION.</u>	1
<u>CHAPITRE I.</u>	11
1. Les différentes hypothèses biogénétiques émises sur le mode de formation des pigments flavoniques.	11
2. Vérifications expérimentales apportées à ces hypothèses	23
2.1. Les unités types C_6-C_3 (phényl-propane) et C_2 (acétique), précurseurs biogénétiques.	23
2.2. Les chalcones : composés intermédiaires dans la chaîne métabolique conduisant aux flavonoïdes.	38
3. Conclusions.	41
<u>CHAPITRE II.</u> ISOLEMENT et IDENTIFICATION des COMPOSES FLAVONIQUES	43
1. Introduction.	43
2. Composés flavoniques contenus dans le bois de <u>Prunus avium</u> (merisier)	44
3. Composés flavoniques contenus dans le bois de <u>Robinia pseudoacacia</u> .	50
4. <u>Prunus Mahaleb</u> .	58
5. Fusion alcaline des composés flavoniques.	62
6. Conclusions.	64

	page
<u>CHAPITRE III.</u> UTILISATION DES COMBINAISONS BISULFITIQUES D'ALDEHYDES AROMATIQUES DANS LES SYNTHÈSES RADIOCHIMIQUES.	65
1. Introduction.	65
2. Méthodes de préparation des acides cinnamique et phényl- pyruvique.	67
3. Synthèses radioactives mises au point à partir de combinaisons bisulfitiques d'aldéhydes aromatiques.	76
4. Partie expérimentale	84
 <u>CHAPITRE IV.</u> INCORPORATION DES ACIDES TRANS CINNAMIQUE ^{14}C - 3 ET PHENYL PYRUVIQUE ^{14}C - 3, DANS LES FLAVANONES ET FLAVANONOLS.	91
1. Introduction.	91
2. Incorporation de l'acide trans cinnamique ^{14}C - 3 dans les flavanones et flavanonols.	92
3. Incorporation de l'acide trans cinnamique ^{14}C - 3 dans les flavanones et flavanonols de <u>Prunus Mahaleb</u> .	96
4. Etude cinétique de l'incorporation de l'acide trans cinnamique ^{14}C - 3, dans les composés flavoniques de <u>Prunus Mahaleb</u> .	100
Partie expérimentale.	108
 <u>CONCLUSIONS GÉNÉRALES.</u>	135
 <u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.</u>	139

INTRODUCTION

=====

1. GENERALITES.

Pour identifier les étapes intermédiaires d'une chaîne métabolique et établir des filiations biogénétiques, l'utilisation des précurseurs marqués s'est généralisée. Cette méthode a constitué notre principal outil de travail dans l'étude de la biogénèse de certains composés flavoniques, étude que nous avons entreprise depuis 1953.

Dans une chaîne métabolique :



chaque réaction individuelle est catalysée par un enzyme particulier.

L'administration, à un organisme contenant cette chaîne métabolique, d'un précurseur A marqué entraîne l'apparition de l'isotope successivement dans les composés B, C, D, E, etc... L'administration d'un composé intermédiaire marqué, tel que C, entraîne également le marquage des composés D, E, etc..., mais aussi, par suite de la présence de réactions réversibles, le marquage de B et de A.

L'étude de la vitesse d'apparition ou de disparition de la radioactivité, dans chaque composé en fonction du temps, permet de tirer des conclusions sur la filiation de ces composés entre eux.

Il importe aussi de vérifier que, dans chaque composé intermédiaire, l'isotope n'est pas éliminé au cours des réactions étudiées (cas par exemple d'un acide marqué avec le ^{14}C sur la fonction carboxylique $\text{R} - ^{14}\text{COOH}$; cet acide peut être décarboxylé au cours des transformations successives. Ceci ne nous permet donc pas d'obtenir des renseignements sur le devenir du radical restant $\text{R} -$ de la molécule).

2. METHODE GENERALE D'ETUDE DE CHAINES METABOLIQUES, A L'AIDE DE MOLECULES MARQUEES (11, 12, 111, 125, 146)

Pour étudier la chaîne métabolique :



le composé A radioactif (*A) est administré et les concentrations isotopiques ($^{\circ}$) $i_A, i_B, i_C \dots$ des composés A, B, C ... déterminées en fonction du temps.

2.1. Variation de la radioactivité du composé A, en fonction du temps.

Si N_A et *N_A représentent respectivement le nombre total de molécules et le nombre de molécules radioactives du composé A, ces deux nombres sont reliés entre eux par la relation :

$$^*N_A = N_A i_A$$

La période biologique ($^{\circ\circ}$) du composé A = T_A , dans la transformation considérée, permet de définir un coefficient λ_A qui est caractéristique du composé A et de la réaction envisagée.

$$\lambda_A = \frac{0,693}{T_A}$$

L'équation donnant la variation de N_A , en fonction du temps t , est de la forme :

$$1 \quad N_A = N_{oA} e^{-\lambda_A t}$$

(N_{oA} : nombre de molécules de A au début de l'expérience.)

De même, 1 donne 2 :

$$2 \quad N_A i_A = N_{oA} i_A e^{-\lambda_A t}$$

ou

3

$$\boxed{^*N_A = ^*N_{oA} e^{-\lambda_A t}}$$

($^{\circ}$) concentration isotopique = $\frac{\text{nombre de mol. radioact. du composé}}{\text{nombre de mol. totales du même composé}}$

($^{\circ\circ}$) période biologique : temps nécessaire pour transformer la moitié des molécules de A, présentes au temps initial, en molécules B.

Cette équation suppose que la période de l'élément radioactif utilisé est très supérieure à la période biologique T_A du composé A étudié : c'est en général le cas des expériences faites avec ^{14}C , la période du ^{14}C étant de 5600 ans.

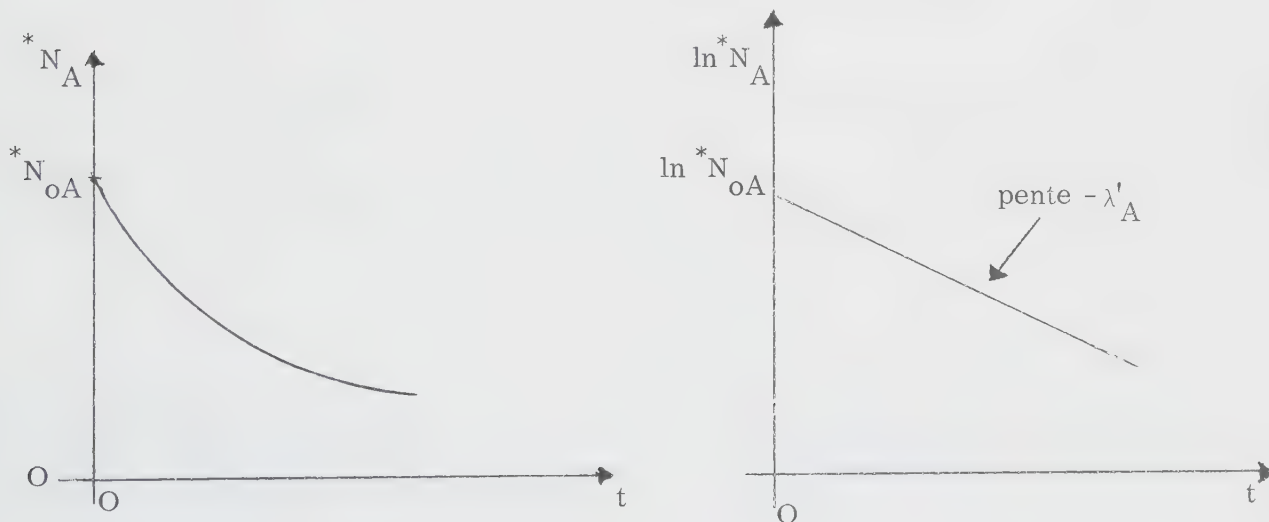
Dans le cas contraire, il faut, dans l'équation 3 trouvée, tenir compte de la décroissance naturelle de l'élément radioactif choisi ; si λ est sa constante de désintégration, l'équation 3 devient 3' :

$$^*N_A = ^*N_{oA} e^{-\lambda_A t} e^{-\lambda t}$$

ou 3'

$$^*N_A = ^*N_{oA} e^{-\lambda'_A t} \quad \text{avec } \lambda'_A = \lambda_A + \lambda$$

La variation du nombre de molécules radioactives du composé A : *N_A est, dans tous les cas, une fonction décroissante et exponentielle.



2.2. Variation de la radioactivité des composés A et B, en fonction du temps.

En reprenant les mêmes notations pour le composé B, la perte ou le gain des molécules radioactives *B , pendant l'intervalle de temps dt , est :

$$d^*N_B = d(N_B i_B)$$

Si B provient directement de A, la quantité de *B , après un certain temps, est égale à la somme algébrique des molécules formées à partir de A et des molécules B disparues pour donner C. En désignant par v_A et v_B les deux vitesses, l'équation 4 relie ces paramètres.

$$4 \quad \frac{d(N_B i_B)}{dt} = v_A i_A - v_B i_B$$

Quand il y a équilibre dans l'organisme, le nombre de molécules B est constant.

$$N_B = C^{te}$$

et la vitesse d'apparition de B (ou vitesse de disparition de A) est égale à la vitesse de disparition de B.

$$v_A = v_B = v$$

L'équation 4 devient :

$$5 \quad N_B \frac{di_B}{dt} = v (i_A - i_B)$$

L'équation 5 représente la dérivée de la fonction $^*N_B = f(t)$ qui traduit les variations de concentration isotopique de B en fonction du temps.

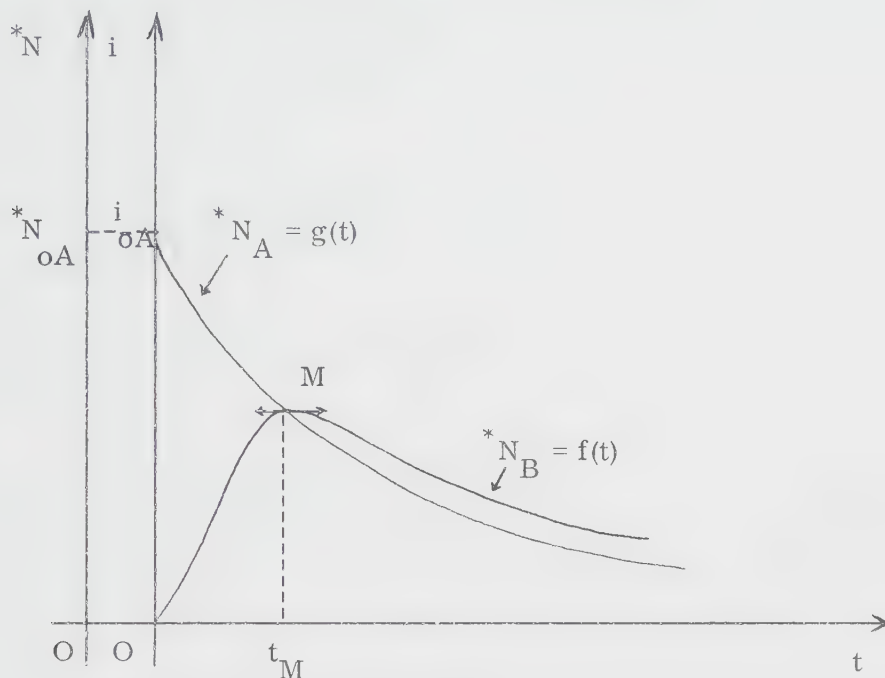
Trois cas sont à envisager :

$$i_A > i_B \quad N_B \frac{di_B}{dt} > 0 \quad \text{la fonction } f(t) \text{ est croissante}$$

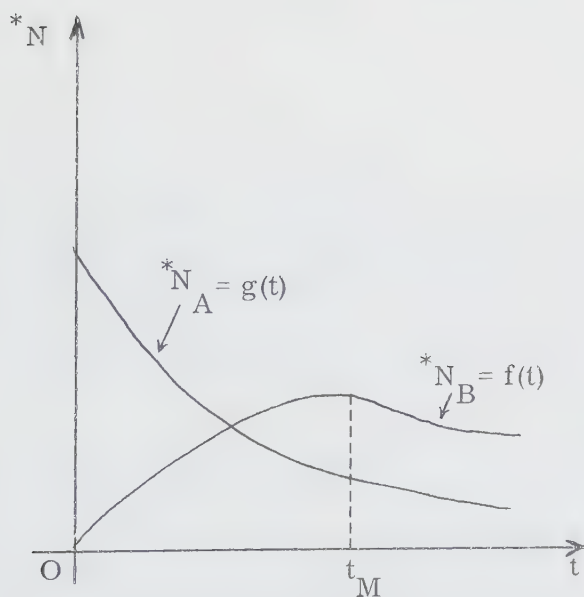
$$i_A < i_B \quad N_B \frac{di_B}{dt} < 0 \quad \text{la fonction } f(t) \text{ est décroissante}$$

$$i_B = i_A \quad N_B \frac{di_B}{dt} = 0 \quad \text{la fonction } f(t) \text{ passe par un maximum M qui est aussi un point représentatif de la fonction } 3' \text{ traduisant les variations de } ^*N_A, \text{ en fonction du temps (voir courbes ci-après).}$$

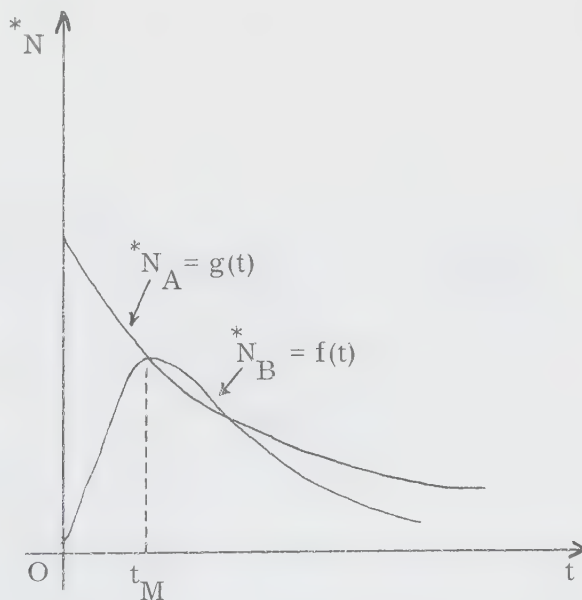
Si nous déterminons *N_A et *N_B , en fonction du temps, et si $A \longrightarrow B$ directement, nous avons le graphique suivant :



En particulier, nous pourrions dire que A n'est pas précurseur direct de B, si nous obtenons les courbes suivantes :



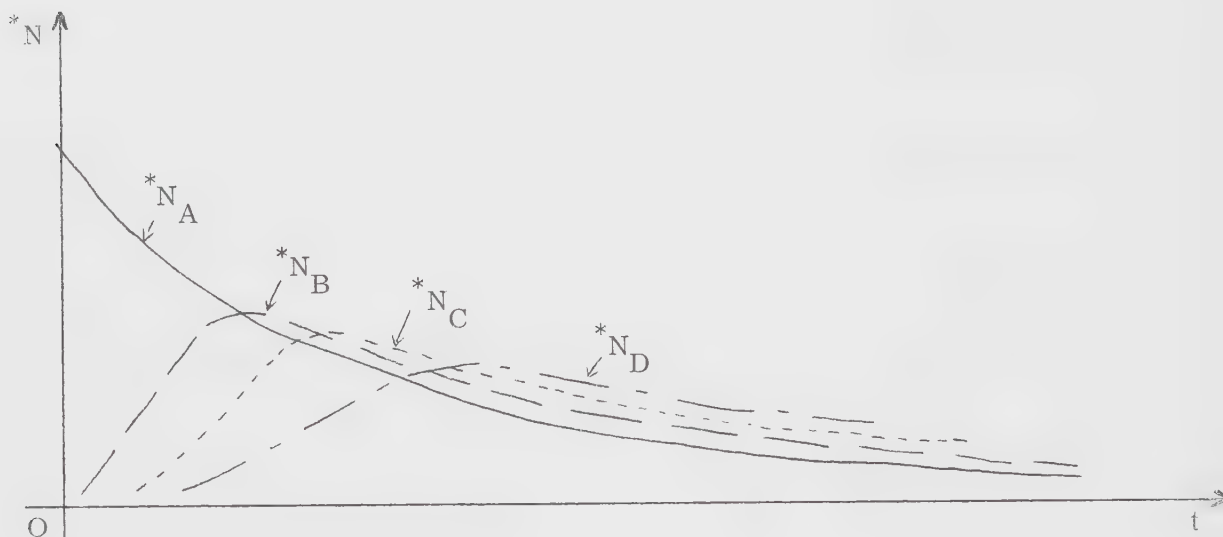
position du maximum d'activité de B nettement en dehors des points de la courbe d'activité de A



pour des temps $t > t_M$
 i_B devient inférieur
à i_A

2.3. Etude de la chaîne métabolique entière.

En généralisant, nous pouvons étudier la chaîne métabolique entière, en déterminant en fonction du temps les activités de A, B, C, etc... Nous aurons alors les courbes suivantes :



2.4. Remarques.

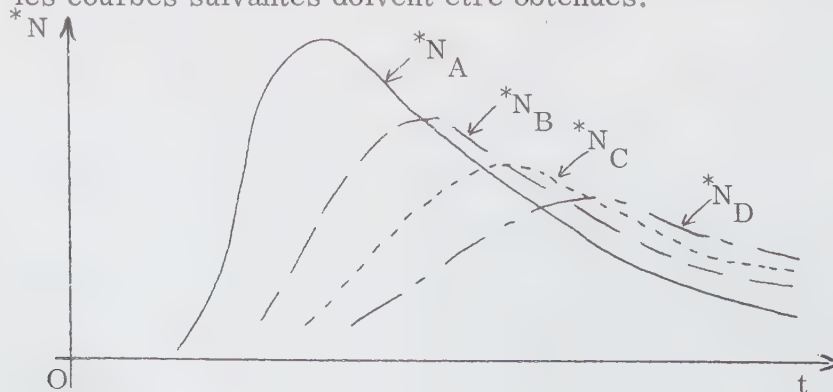
Pour utiliser cette technique, il faut :

- avoir une idée sur la structure du composé A,
- pouvoir incorporer l'élément radioactif dans la molécule A, de manière à le retrouver dans B, après la transformation :



Il est parfois plus avantageux d'administrer un précurseur Y de A qui peut être assez éloigné, de manière à ne pas créer trop de perturbations dans la portion étudiée. L'avantage du précurseur Y peut-être aussi une synthèse plus aisée.

Dans ces conditions particulières, en suivant les activités des composés A, B, C, les courbes suivantes doivent être obtenues.



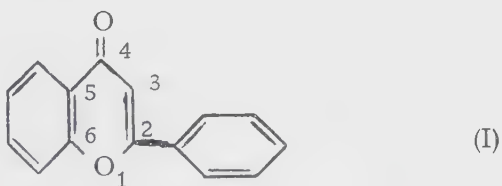
3. CHAINES METABOLIQUES.

La cellule vivante possède un certain nombre de chaînes métaboliques, telles que le cycle tricarboxylique ou cycle de Krebs, l'hélice de LYNNEN, le cycle des pentoses, pour lesquelles chaque étape a été étudiée d'une manière approfondie. Pour d'autres, un certain nombre d'étapes et d'intermédiaires sont encore imparfaitement connus.

- Dans le règne animal, la chaîne métabolique conduisant au cholestérol à partir d'unités acétyles a été suivie, étape par étape, jusqu'au squalène ; celles situées entre le squalène et le cholestérol paraissent moins bien établies.

- Dans le règne végétal, les premières réactions photochimiques du cycle de la photosynthèse sont loin d'être complètement élucidées.

De même, chez les végétaux supérieurs, les modes de formation et de filiation des phényl-2 benzo-5,6 γ pyrones (I), plus connues sous les noms de : phényl-2 chromones, pigments flavoniques ou flavonoïdes, n'ont pas encore été systématiquement étudiés et il n'existe que des résultats fragmentaires.

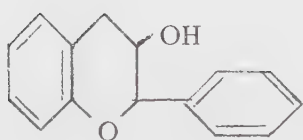
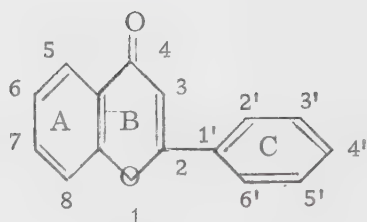


4. PIGMENTS FLAVONIQUES.

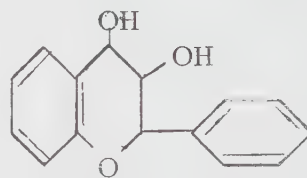
Un simple regard dans la littérature montre l'abondance des pigments flavoniques dans le règne végétal. Leur rôle n'a pas encore été trouvé. Ces pigments, surtout localisés dans les fleurs, se rencontrent également en quantité appréciable dans les autres organes : feuilles, tiges et même dans le bois pour les espèces végétales supérieures.

Une classification des flavonoïdes repose sur le degré d'oxydation ou de réduction des carbones 2, 3 et 4 de la phényl-2 chromone.

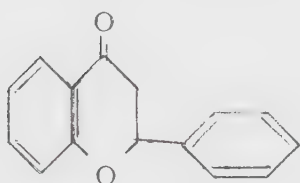
La nomenclature utilisée sera la suivante :



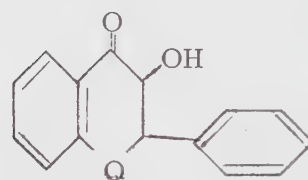
Catéchine ou flavanol 3



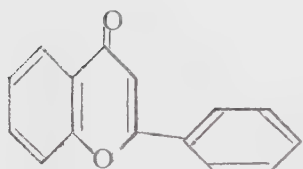
Leucoanthocyane ou flavane diol 3-4



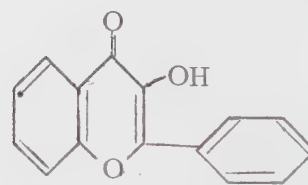
flavanone



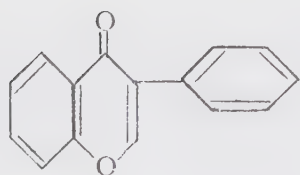
flavanonol



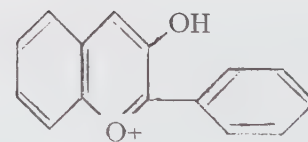
flavone



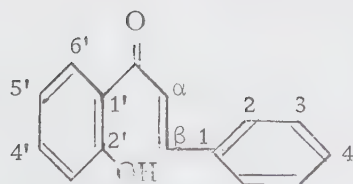
flavonol



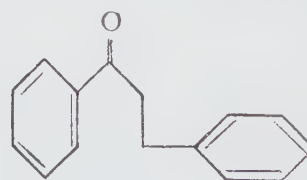
isoflavone



anthocyanidol
(appelé aussi anthocyane)

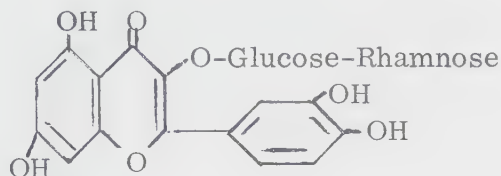


hydroxy 2' chalcone



dihydrochalcone

Ces dérivés se rencontrent le plus souvent avec des substituants (hydroxyle, méthoxyle, glucosyle, rhamno-glucosyle, etc...) sur leur squelette. Ainsi, la rutine (II), ou rhamno-glucosyl-3 tétrahydroxy-5, 7, 3', 4' flavonol, est un des composés les plus répandus dans le règne végétal.



(II) rutine

Par suite de la parenté chimique assez étroite qui existe entre ces différentes familles de composés, de nombreux auteurs ont émis des hypothèses d'interconversion possible entre eux, par simple oxydation ou réduction, hydratation ou déshydratation du noyau B.

Les différentes transformations envisagées théoriquement ne sont pas encore entièrement démontrées *in vivo*. Dans le but de déterminer quelques-unes des étapes de ce métabolisme, des recherches ont été entreprises au Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lyon, au Laboratoire de chimie appliquée aux corps organisés du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris, puis au Laboratoire de Biochimie de l'Institut National des Sciences Appliquées, de LYON.

Le travail exposé ci-après groupe un certain nombre de résultats obtenus dans ce domaine ; il comprend quatre parties principales :

- CHAPITRE I - Enoncé des différentes hypothèses biogénétiques émises.
Preuves expérimentales apportées.
- CHAPITRE II - Etude et identification des flavonoïdes contenus dans Prunus avium,
Robinia pseudoacacia, Prunus Mahaleb.
- CHAPITRE III - Synthèse des acides cinnamiques et phénylpyruviques ^{14}C - 3, à
partir de combinaisons bisulfiteiques d'aldéhydes aromatiques.
- CHAPITRE IV - Etude de l'incorporation de différents précurseurs marqués dans
les flavonoïdes, chez Robinia pseudoacacia, Prunus avium et
Prunus Mahaleb.

Etude cinétique de l'incorporation de ces molécules, afin de déterminer une filiation possible des pigments flavoniques entre eux.

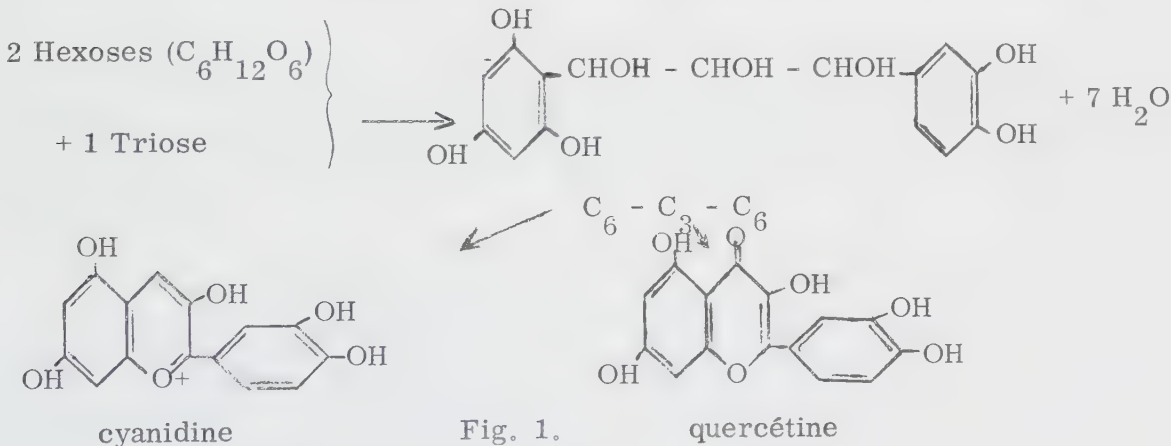
[illegible]

1. LES DIFFERENTES HYPOTHESES BIOGENETIQUES EMISES SUR LE MODE DE FORMATION DES PIGMENTS FLAVONIQUES.

1.1. Hypothèse de ROBINSON.

Dès 1936, ROBINSON (114) propose un schéma biosynthétique, entièrement théorique, conduisant aux pigments flavoniques et anthocyaniques.

Deux molécules d'hexoses se condensent avec un triose pour donner naissance à un composé hydroxylé intermédiaire $C_6-C_3-C_6$ qui, par déshydratation, oxydation et cyclisation, peut donner la cyanidine et la quercétine (Fig. 1).



1.2. Hypothèse biogénétique énoncée à partir d'études faites chez certains mutants végétaux.

Chez les plantes, à côté des dérivés flavoniques, il existe souvent des pigments anthocyaniques (35). Or, les études sur les mutants d'une même espèce végétale, réalisées par ONSLOW (90) SCOTT-MONCRIEFF (5, 121, 122,), LAWRENCE (75), GEISSMAN et HARBORNE (36), ont montré que la présence de certains gènes chez des mutants de la forme sauvage de Lathyrus par exemple

favorise la formation des composés flavoniques au détriment des pigments anthocyaniques. Le phénomène inverse se manifeste chez d'autres mutants où existent des gènes agissant dans le sens opposé ; par contre, chez Antirrhinum et Pharbitus, sous l'action concomitante de divers types de gènes, se forment simultanément des pigments flavoniques et anthocyaniques. Un schéma biogénétique a été proposé à la suite de ces travaux (Fig. 2).

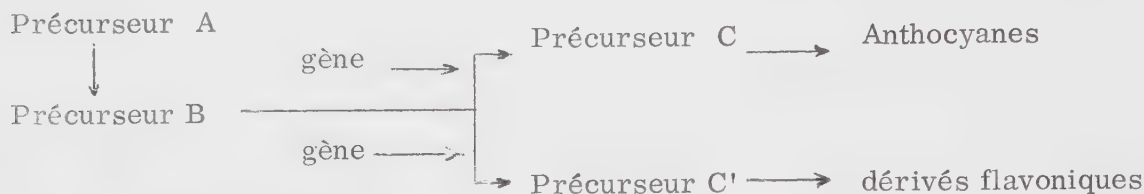


Fig. 2

1.3. Hypothèse de C. MENTZER.

En 1952, MENTZER (81), à la suite de l'isolement, en collaboration avec PACHECO (83, 84), de la pinocembrine (dihydroxy-5, 7 flavanone) dans le bois de cœur de cerisier, suggère que la phloroglucine (unité en C_6) peut se condenser avec l'acide cinnamique (unité type phényl-propane C_6-C_3) "in vivo", pour donner cette flavanone (fig. 3).

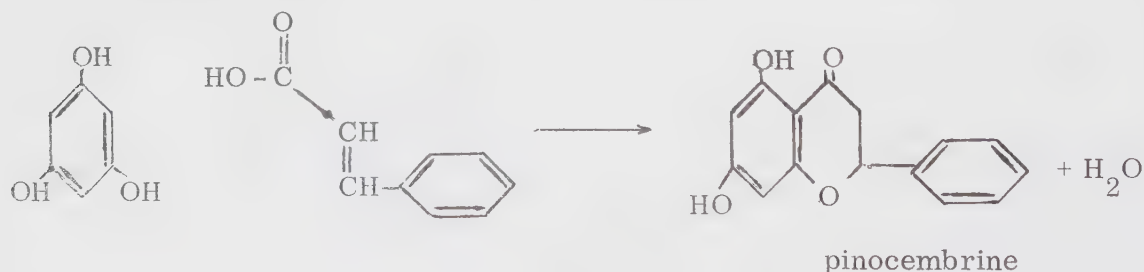


Fig. 3.

1.4. Hypothèse de BIRCH et DONOVAN.

En 1953, BIRCH et DONOVAN (8) formulent une hypothèse biogénétique suivant laquelle le noyau A des composés flavoniques dérive d'unités acétiques :

3 molécules d'acide acétique s'unissent pour donner un acide poly- β -cétonique qui, par condensation avec une unité type phényl-propane C_6-C_3 , fournit un composé $C_6-C_3-C_6$. Ce dernier, par cyclisation, peut engendrer les pigments flavoniques (fig. 4.).

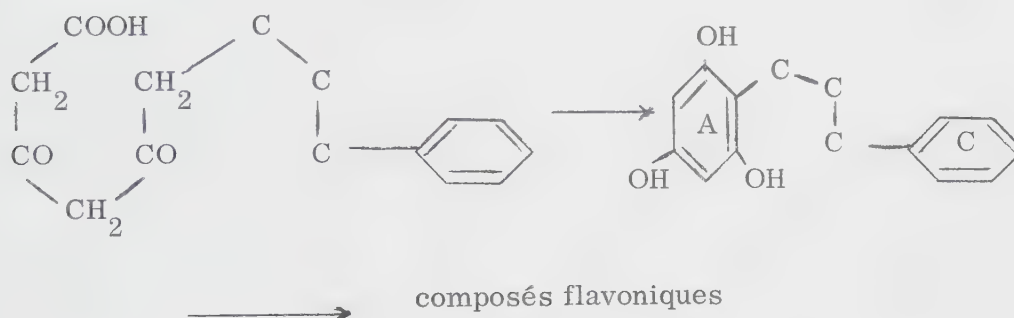


Fig. 4

BIRCH et DONOVAN (8), puis WATKIN, UNDERHILL et NEISH (137) font d'ailleurs remarquer que l'activation de ces unités acétates peut se faire suivant des réactions analogues à celles impliquées dans la synthèse des acides gras (71) (Schéma fig. 5).

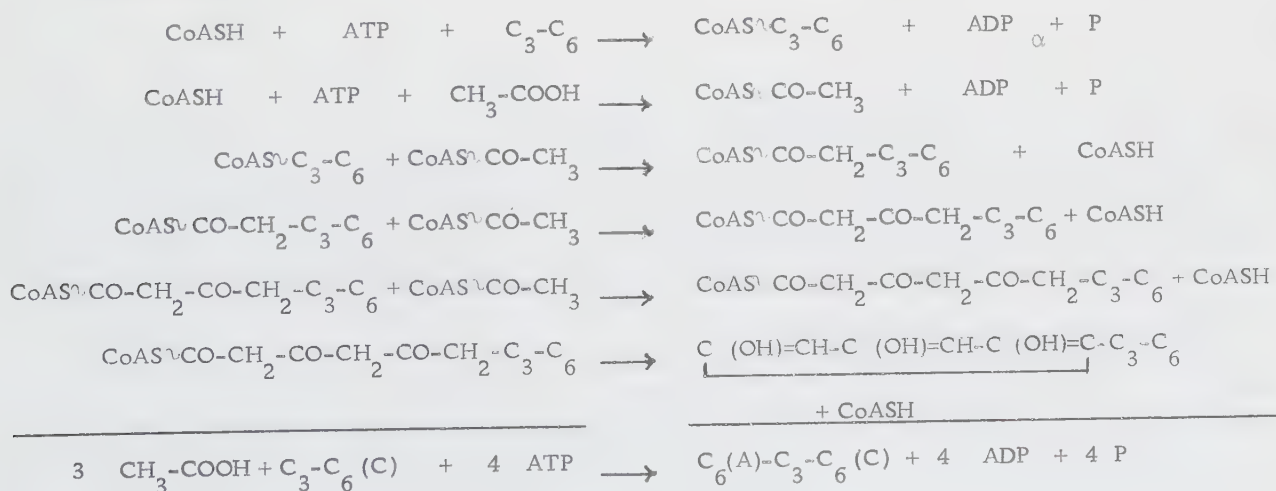


Fig. 5.

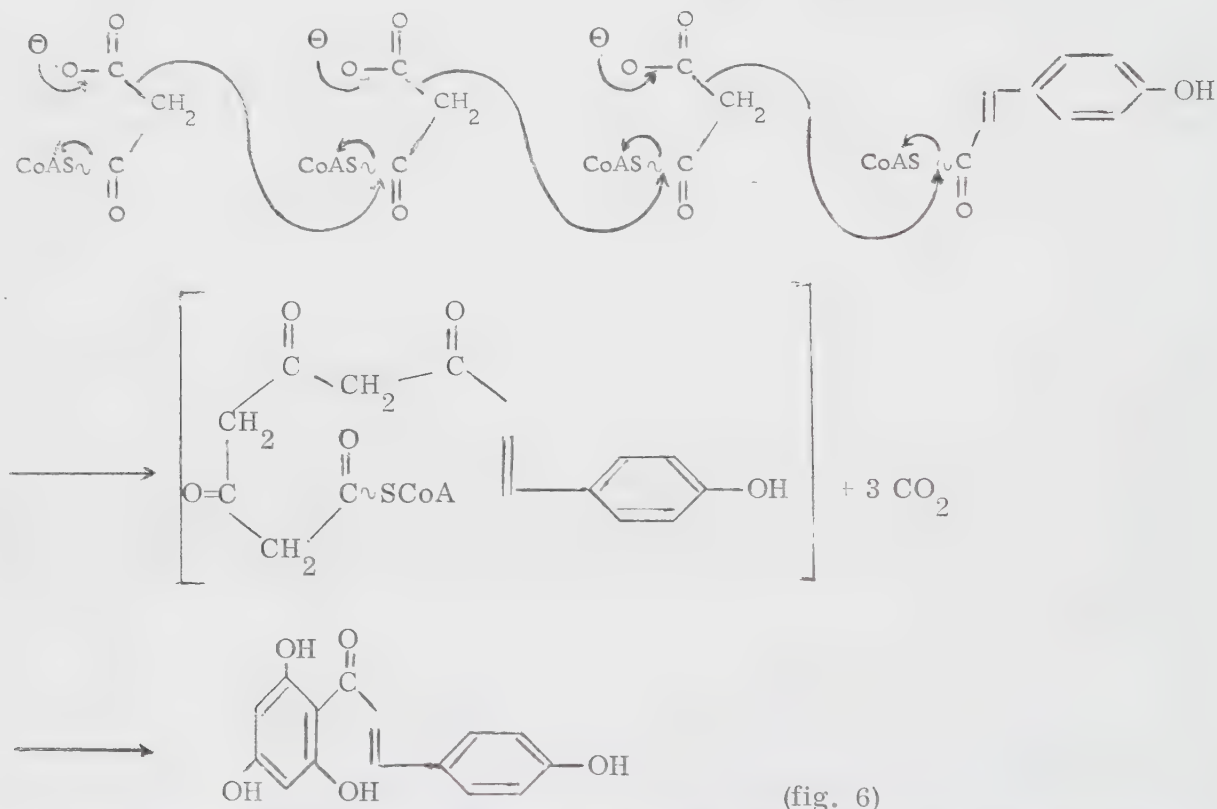
CoASH : coenzyme A

P : phosphate

ATP : adénosine triphosphate

ADP : adénosine diphosphate

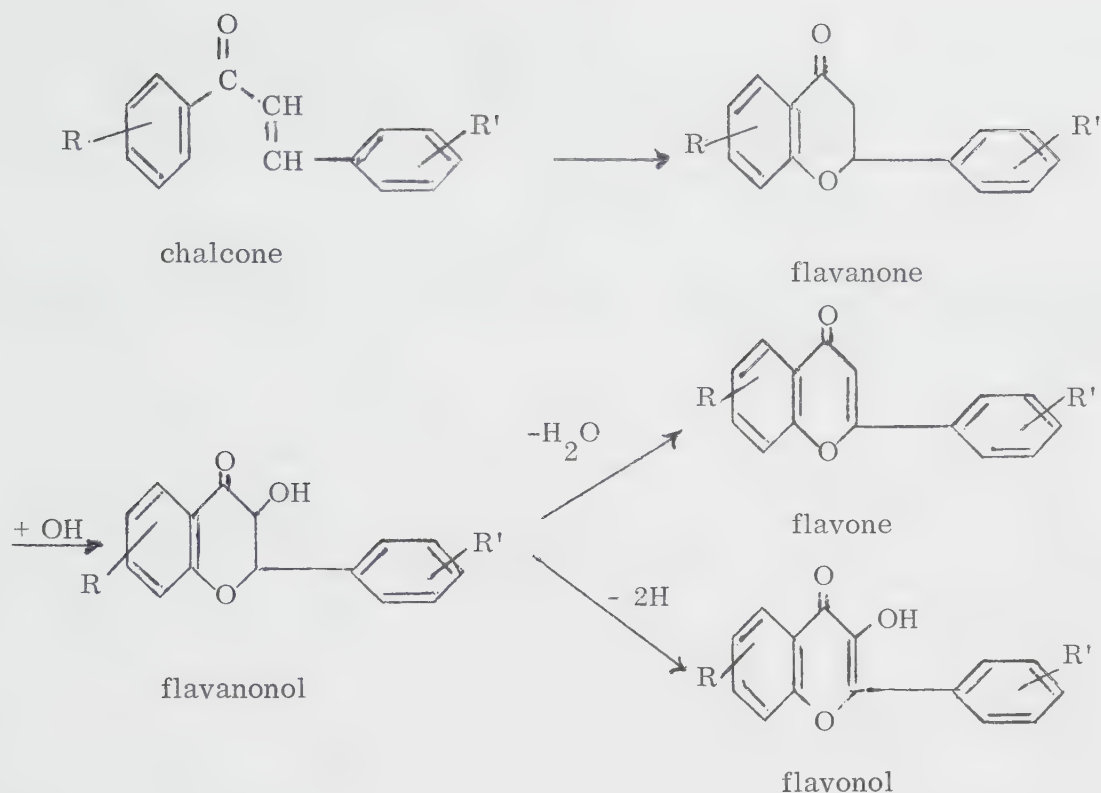
Quelques années plus tard, à la suite de la mise en évidence du deuxième mécanisme de biosynthèse des acides gras par WAKIL (136), LYNEN et TADA (77) démontrent, par un raisonnement thermodynamique, que les acides poly- β -cétoniques ne peuvent être formés qu'à partir du malonyl-CoA. A la suite de cette publication, GRISEBACH (46) suppose que l'activation des unités acétiques nécessaires à la biosynthèse des pigments flavoniques s'effectuerait sous forme de malonyl-CoA, conformément au schéma ci-dessous (Fig. 6).



Remarque : Le coenzyme A, dans toutes ces réactions, peut être remplacé par ACP (acyl carrier protein) (136).

1.5. Hypothèse de SESHADRI.

SESHADRI (123), se basant sur la similitude des types de substitution des divers composés flavoniques contenus dans un grand nombre d'espèces végétales, émet l'hypothèse d'une filiation de ces pigments à partir des chalcones (fig. 7).



R, R' = substituents nucléaires,
tels que OH, OCH₃, etc....

fig. 7

En effet, l'interconversion des chalcones en flavanones est bien connue "in vitro" et se réalise facilement par acidification ou par chauffage. L'hydroxylation en 3 des flavanones ainsi obtenues peut s'effectuer par traitement des flavanones ou glucosides de flavanone à l'eau oxygénée, en milieu alcalin (1, 58, 88, 91, 95, 100). Les flavanonols ou glucosides de flavanonol ainsi préparés peuvent ultérieurement se déshydrogéner en flavonols ou glucosides de flavonol, en présence d'un excès d'eau oxygénée. CHOPIN et DURUAL (19, 30) ont montré que la transformation des époxydes de benzyloxy-2' chalcones (obtenus à partir des chalcones correspondantes) en flavanonols est réalisable "in vitro" dans certains cas. De plus SESHADRI (123) a montré que les flavanonols possédant leur atome d'hydrogène en 2 et leur groupement hydroxylé en 3 en position axiale peuvent sous l'action d'agents chimiques, subir une transdéshydratation et donner des flavones.

Dans ce schéma, les flavanonols occupent une position privilégiée dans la filiation des composés flavoniques.

1.6. Hypothèse de PACHECO, MENTZER.

En 1957, PACHECO et MENTZER (93) supposent que l'acide phényl-pyruvique, sous forme énoisée, peut se condenser avec la phloroglucine pour engendrer les flavanonols (fig. 8).

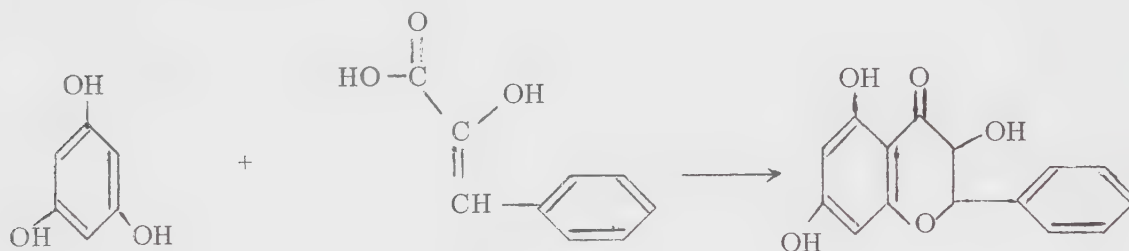


Fig. 8

"In vitro", COILLARD, MOLHO, MENTZER et PACHECO (22) ont montré que cette condensation, réalisée en présence d' AlCl_3 , conduit toujours à des benzal-3 coumaranones-2.

1.7. Hypothèse de WATKIN, UNDERHILL et NEISH.

A la suite de l'étude de la biosynthèse de la quercétine (tétrahydroxy-5, 7, 3', 4' flavonol), WATKIN, UNDERHILL et NEISH (137) pensent que l'acide phényl-pyruvique, sous forme énolysée, se condense avec 3 molécules d'acétyl-CoA pour donner un premier, puis un deuxième intermédiaire qui, par cyclisation oxydative, fournit la quercétine (fig; 9.).

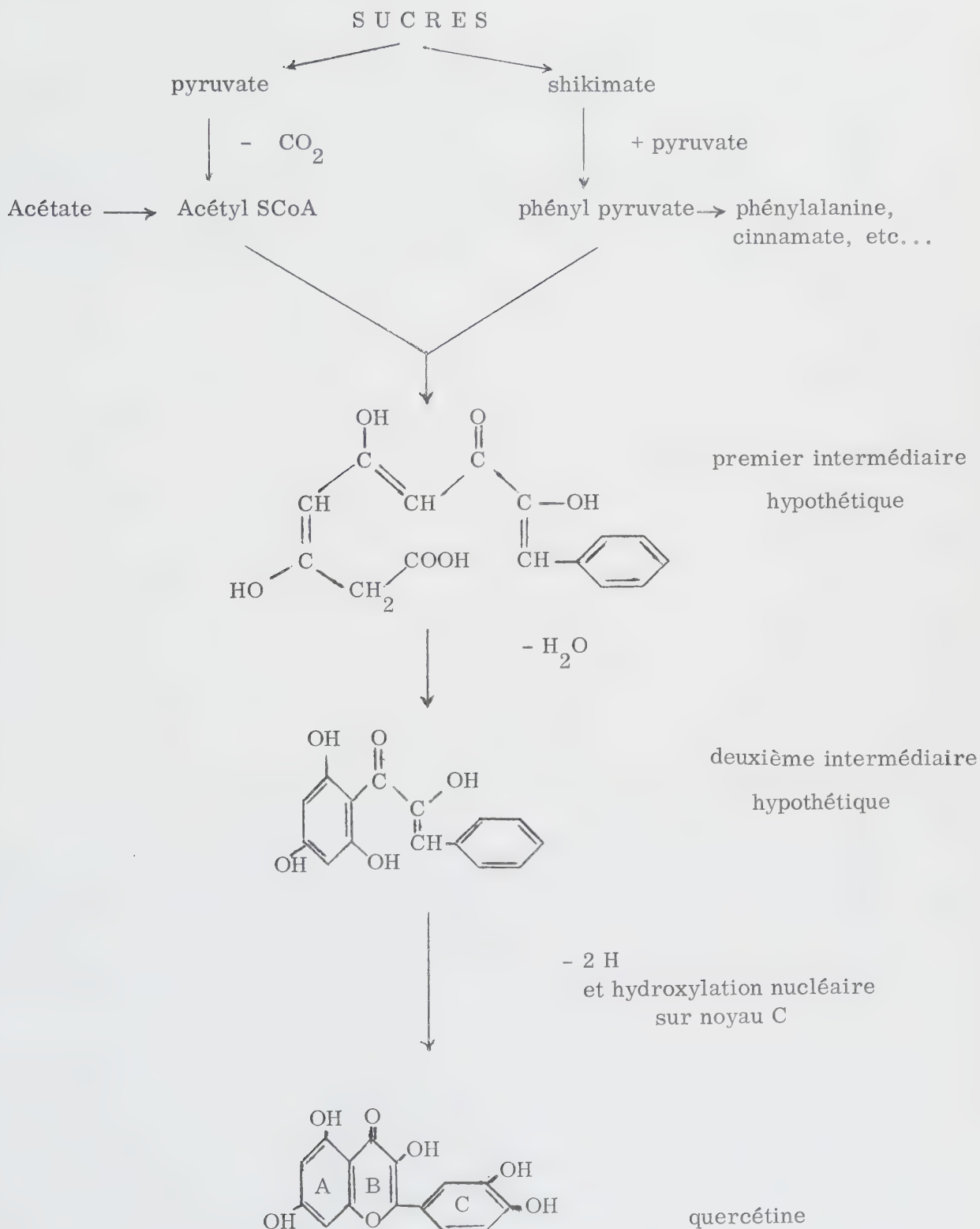


Fig. 9.

1.8. Hypothèse de PACHECO.

En 1960, PACHECO (95), au cours de l'étude des rapports entre la prunine et le glucosyl 7 kaempférol, remarque que les aglycones sont surtout localisés dans le bois de cœur et les hétérosides dans les feuilles et l'aubier. C'est pourquoi il suppose que l'hydroxylation en 3 des flavanones et la déshydrogénation des flavanonols en flavonols s'effectuent non pas comme le mentionne SESHADRI sur les aglycones libres, mais sur leurs hétérosides et que, après transfert des hétérosides des feuilles vers l'aubier, les aglycones sont libérées par hydrolyse enzymatique (fig. 10).

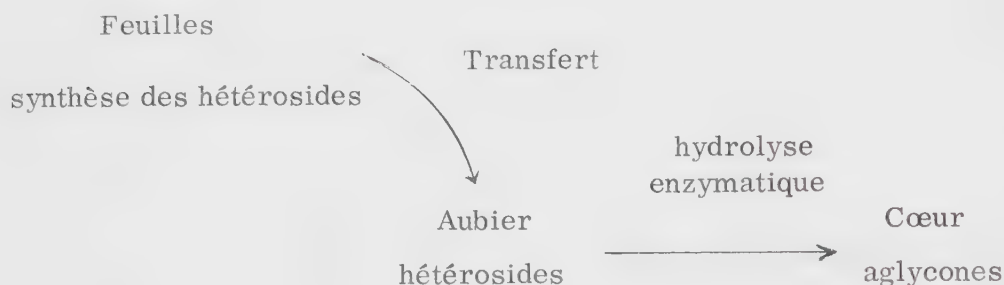


Fig. 10

1.9. Hypothèse de GRISEBACH sur la biosynthèse des isoflavones.

A la suite de ses travaux sur la biosynthèse des isoflavones, GRISEBACH (44) donne un schéma conduisant aux flavanonols, flavonols et aux isoflavones, en introduisant un composé hypothétique intermédiaire qui serait un époxyde de chalcone (fig. 11).

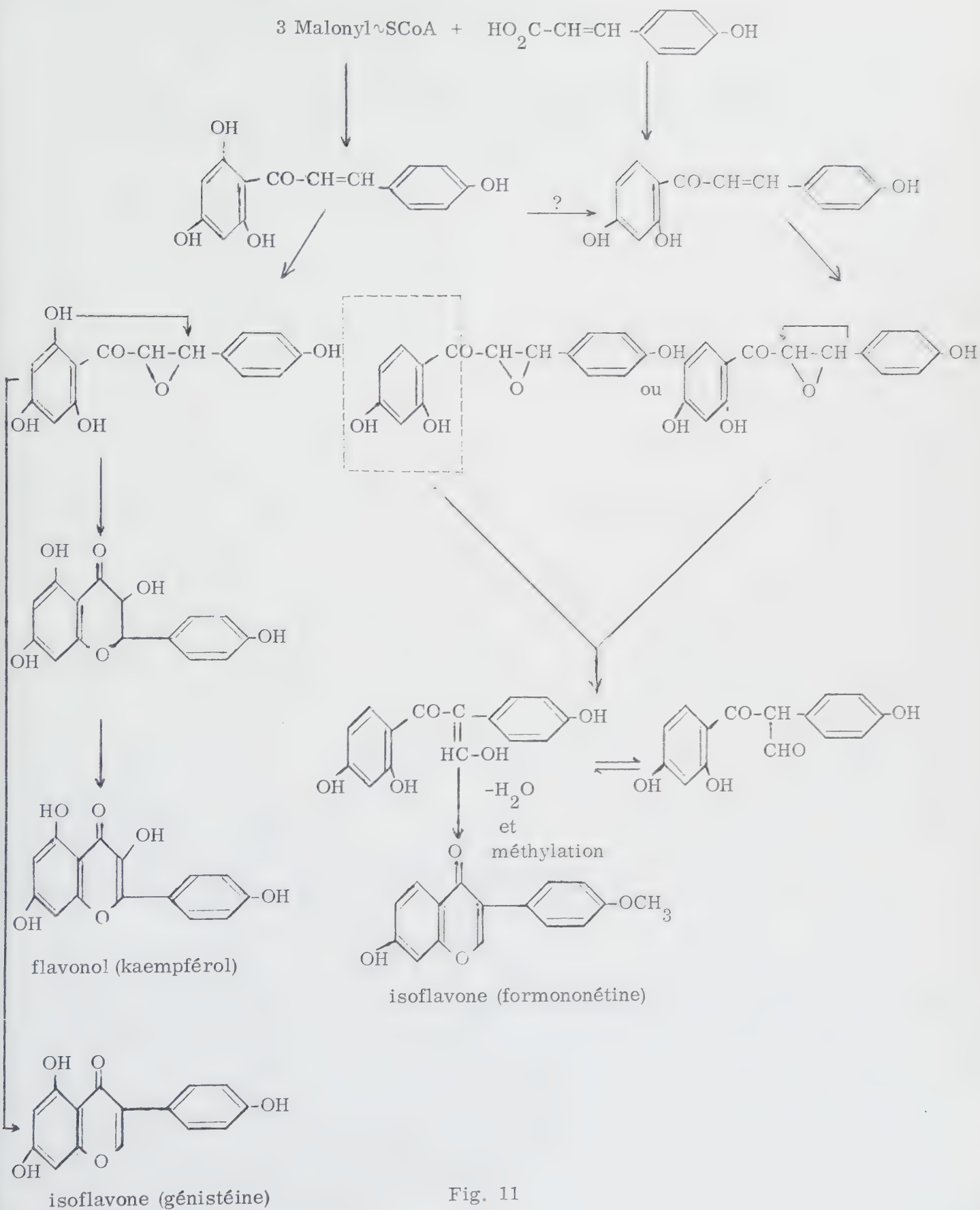


Fig. 11

1. 10 Mises au point.

Différentes mises au point (7, 9, 45, 89, 145), faites sur la biosynthèse des flavonoïdes, ont permis aux auteurs de donner des tableaux plus complets sur la formation des flavonoïdes et la filiation possible des composés flavoniques entre eux.

1. 10. 1 Mise au point de BOGORAD.

BOGORAD (9), dans une mise au point sur la biogénèse des composés flavoniques, envisage les différentes unités C_6-C_3 (acide cinnamique, acide benzoyl-acétique, phényl-alanine, acide phényl-pyruvique, acide phényl-lactique, acide β -hydroxy- β phényl-propionique) pouvant engendrer le squelette des flavonoïdes (fig. 12).

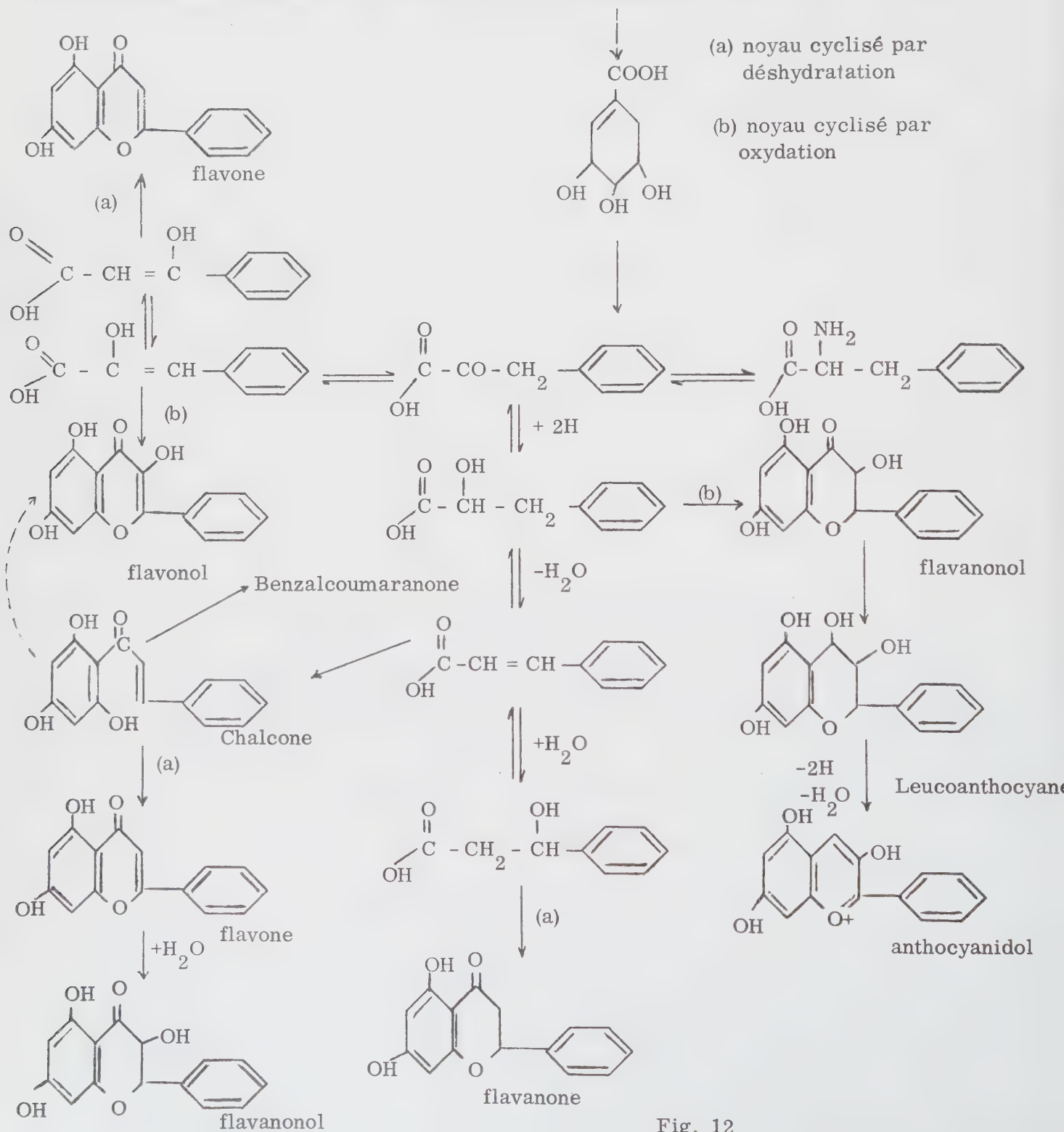


Fig. 12

1.10.2. Mise au point de ZAPROMETOV.

Cet auteur (145) donne un schéma biogénétique qui conduit aux catéchines, gallo-catéchines et galloyl-catéchines, à partir des hydrates de carbone (fig. 13).

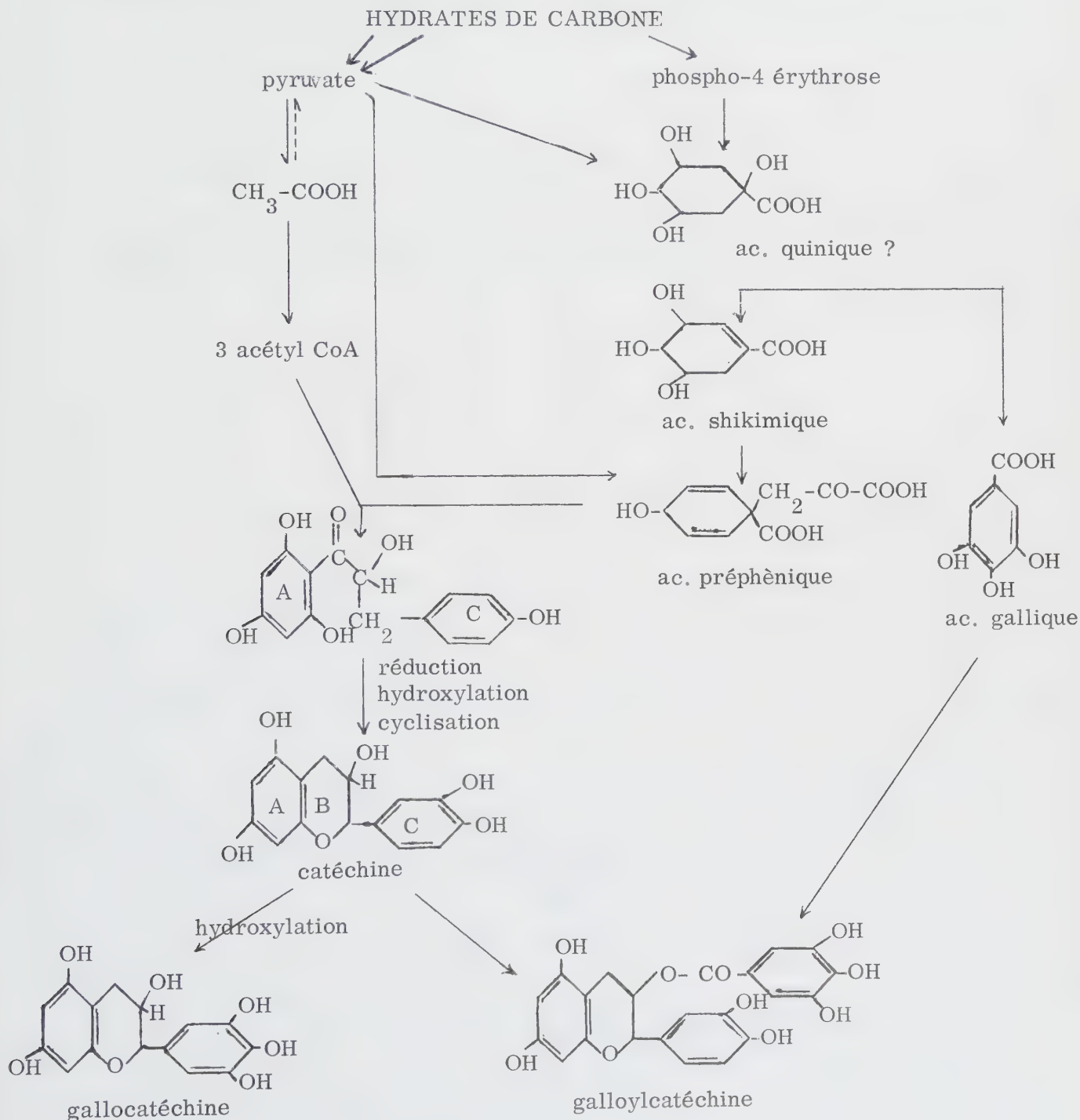


Fig. 13.

1.10.3. Mise au point de GRISEBACH.

Dans une mise au point récente, GRISEBACH (47) souligne le rôle important joué par les chalcones dans la biogénèse des pigments flavoniques. Ces chalcones proviendraient elles-mêmes des acides cinnamiques.

GRISEBACH propose le schéma général suivant (fig. 14.)

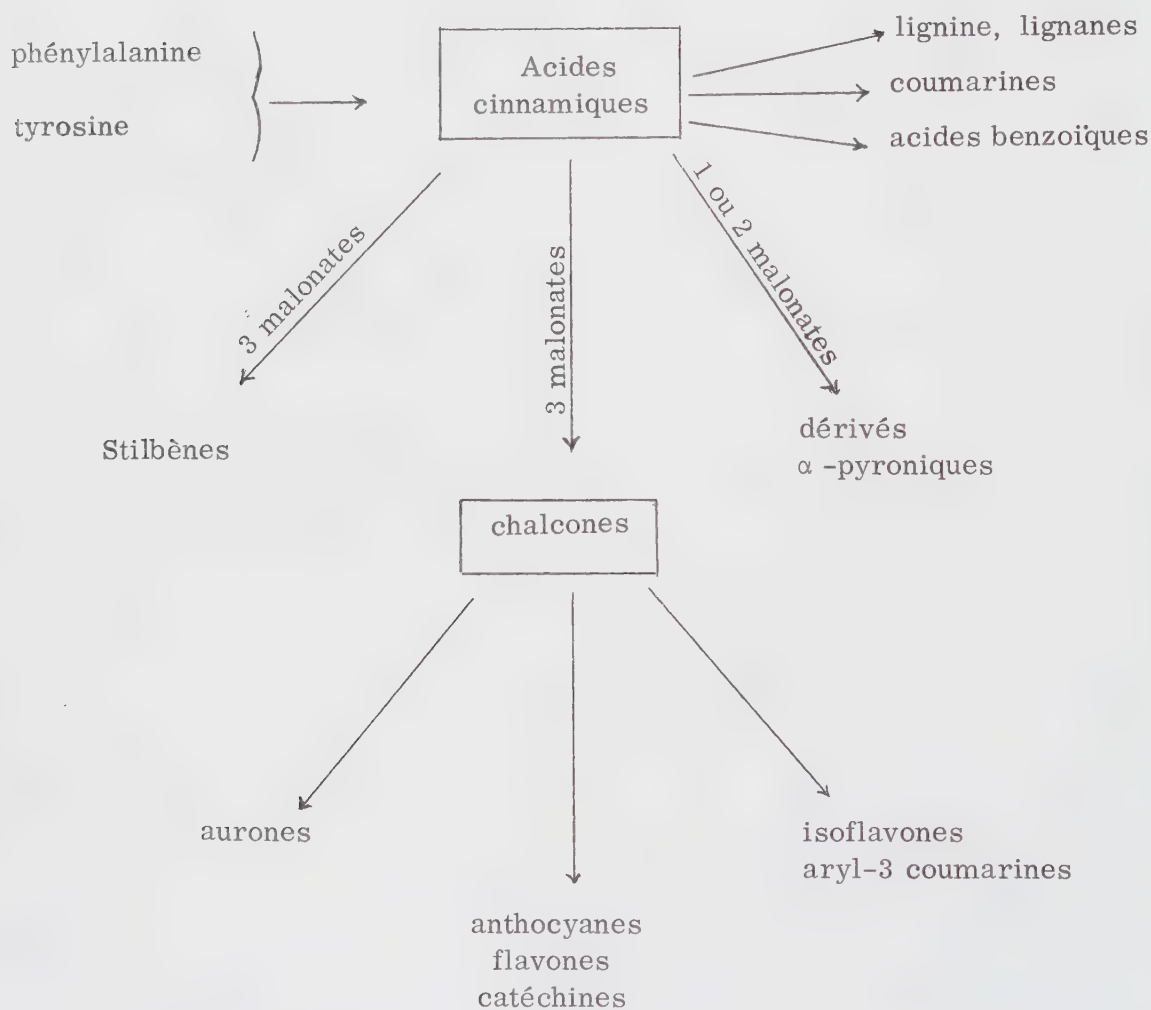


Fig. 14.

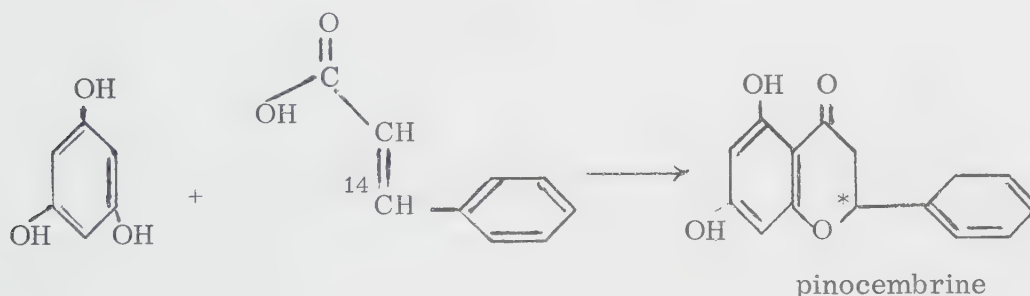
2. VERIFICATIONS EXPERIMENTALES APPORTEES A CES HYPOTHESES.

2.1. Les unités types C₆-C₃ (phényl-propane) et C₂ (acétique) :

précurseurs biogénétiques.

2.1.1. Biosynthèse des dérivés flavoniques et anthocyaniques à partir de l'acide cinnamique (Hypothèse de MENTZER).

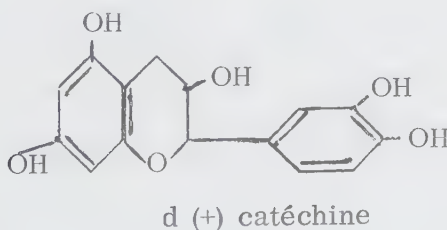
Dès 1956, avec COMTE, ZWINGELSTEIN et MENTZER (23, 24), nous avons administré à de jeunes plants de merisier (*Prunus avium*) de l'acide cinnamique β - (¹⁴C), en vue de vérifier l'hypothèse émise par MENTZER.



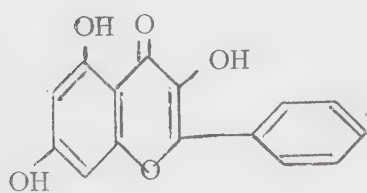
Le bilan assez complet de la répartition de la radioactivité dans les amino-acides, acides organiques, flavonoïdes libres, flavonoïdes combinés (sous forme de glucosides), leucoanthocyanes et sucres, montre une incorporation importante de l'acide cinnamique dans les différents composés flavoniques (flavonoïdes, glucosides de flavonoïdes et leucodérivés) (23). 94 % de la radioactivité récupérée est contenue dans ces composés.

L'examen analytique des différentes fractions nous a permis d'identifier :

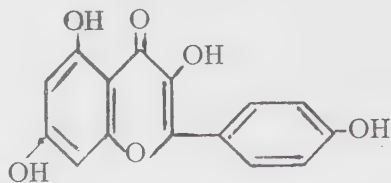
a) une radioactivité assez importante dans la d (+) catéchine



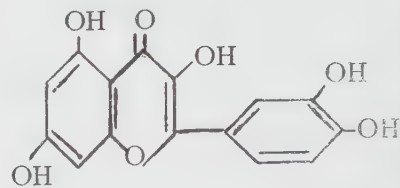
b) une radioactivité notable dans les flavonols des feuilles : galangine, kaempférol et quercétine.



galangine

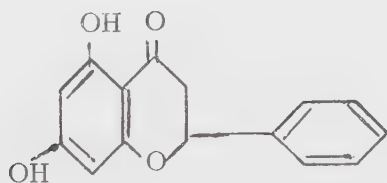


kaempférol

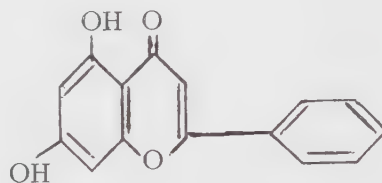


quercétine

c) une incorporation faible dans la dihydrochrysine (pinocembrine) et la chrysine.



dihydrochrysine



chrysine

De ces travaux, découle un ensemble de faits favorables à l'existence d'une hydroxylation du noyau C des flavonols en fonction du temps. De plus, il apparaît qu'une diminution de la radioactivité des glucosides de flavonoïdes en fonction du temps se produit au profit des composés flavoniques libres et des dérivés anthocyaniques.

A la suite de ces résultats, COMTE (23) apporte une conclusion en faveur du schéma de formation des dérivés anthocyaniques et flavoniques, proposé à la suite des études faites sur les mutants végétaux (122). Ce schéma montre que les anthocyanes et les flavonoïdes peuvent se former à partir d'un précurseur commun A, mais que la production de chacun est indépendante de l'autre. Ce phénomène peut être contrôlé et dirigé par tout un ensemble de gènes non déterminés.

Précurseur A



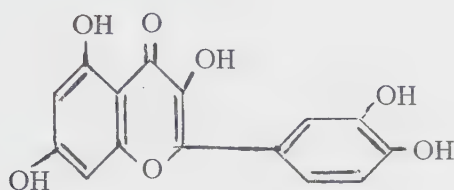
Précurseur B

Précurseur C —————> anthocyanes

Précurseur C' —————> dérivés flavoniques

Ces résultats prouvent également qu'une unité du type phényl-propane C_6-C_3 (acide cinnamique) peut s'incorporer dans les cycles B et C des pigments flavoniques, conformément à l'hypothèse de MENTZER.

2.1.2. Biosynthèse de la quercétine, à partir de différentes unités C_6-C_3 , C_6-C_2 , C_6-C_1 .

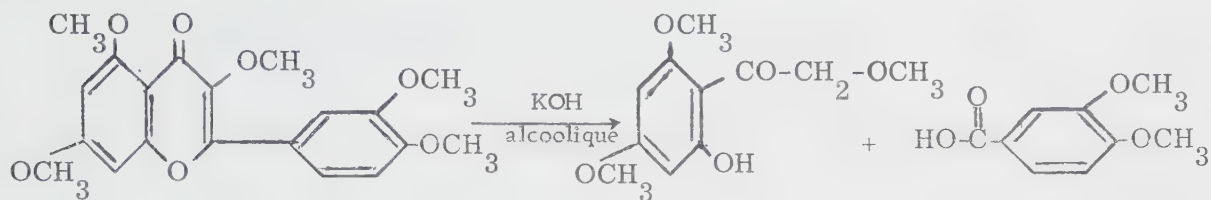


quercétine

UNDERHILL, WATKIN et NEISH (130) ont montré que différentes molécules radioactives peuvent donner de la quercétine, présente dans le sarrasin (Fagopyrum tataricum). Au cours de ces recherches, ils ont obtenu les résultats suivants :

Composés administrés	activité spécifique moléculaire m μ c/mM		dilution
	composé administré	quercétine	
<u>Unité</u> C ₆ -C ₁			
acide shikimique (*)	24200	676	36
ac. p.hydroxybenzoïque carboxyle (¹⁴ C)	103200	7	14350
ac. protocatéchique carboxyle (¹⁴ C)	80500	7	11840
<u>Unité</u> C ₆ -C ₂			
ac. phényl acétique carboxyle (¹⁴ C)	50100	7	7260
<u>Unité</u> C ₆ -C ₃			
L-phényl alanine (*)	50000	756	66
ac. cinnamique carboxyle (¹⁴ C)	52000	350	148
ac. cinnamique α (¹⁴ C)	90100	563	160
ac. cinnamique β (¹⁴ C)	93800	543	173
ac. cinnamique phényle et β (¹⁴ C ₇)	92000	271	338
ac. p.hydroxycinnamique β (¹⁴ C)	31500	170	185
ac. caféique β (¹⁴ C)	39600	31	1268
ac. sinapique β (¹⁴ C)	63600	15	4240
ac.m. méthoxy cinnamique β (¹⁴ C)	104100	23	4502
ac. férulique β (¹⁴ C)	86800	0, 15	578000
(*) uniformément marqué.			

Les différentes quercétines radioactives isolées ont été méthylées et dégradées par la potasse alcoolique en acide vératrique et hydroxy-2' triméthoxy-2,4', 6' acétophénone, puis la radioactivité de ces deux composés a été mesurée.



UNDERHILL et Coll. trouvent la répartition suivante de l'atome traceur :

Précurseur administré	radioactivité trouvée par rapport à la quercétine méthylée	
	hydroxy-2' triméthoxy-2',4',6' acétophénone	acide vératrique
phényl alanine (^{14}C)-3	22,8	78,4
ac. cinnamique carboxyle (^{14}C)	94,3	1,7
ac. cinnamique α (^{14}C)	102	0,2
ac. cinnamique β (^{14}C)	0,2	98
ac. cinnamique phényle et β ($^{14}\text{C}_7$)	0,2	99
ac. p.hydroxy cinnamique β (^{14}C)	0,7	99,5
ac. caféique β (^{14}C)	9,0	85,5

De ces résultats, il ressort que l'unité C_6-C_3 , type acide cinnamique, s'incorpore intacte dans le squelette flavonique. Remarquons cependant que les acides cinnamiques, différemment marqués dans leur molécule, n'ont pas le même taux d'incorporation. En particulier, l'acide cinnamique β (^{14}C) et l'acide cinnamique phényle et β ($^{14}C_7$) ont des taux d'incorporation différents ; ceci peut s'expliquer par l'effet isotopique ; le dernier acide a en effet un poids moléculaire de $7 \times 2 = 14$ unités de plus, soit une variation de 10 % de sa masse molaire.

Il faut toutefois signaler :

a) - que l'acide caféique s'incorpore huit fois moins que les acides para-hydroxycinnamique et cinnamique, ce qui laisse supposer, comme l'a déjà signalé COMTE, une hydroxylation au stade $C_6-C_3-C_6$ du noyau C.

b) - que l'acide shikimique, unité C_6-C_1 , qui est le précurseur des unités C_6-C_3 , comme le montre le tableau ci-après, s'incorpore mieux que les unités C_6-C_3 dans le squelette flavonique, ce qui laisse supposer :

- que nous n'avons pas encore trouvé la véritable unité C_6-C_3 donnant naissance aux composés flavoniques,

- ou que le mode d'activation de ces unités C_6-C_3 "in vivo" est assez lent (*).

(*) HILLIS et ISOI (66) supposent que, dans l'eucalyptus, l'acide para-hydroxycinnamique peut être stocké sous forme d'acide para-coumaroylquinique.

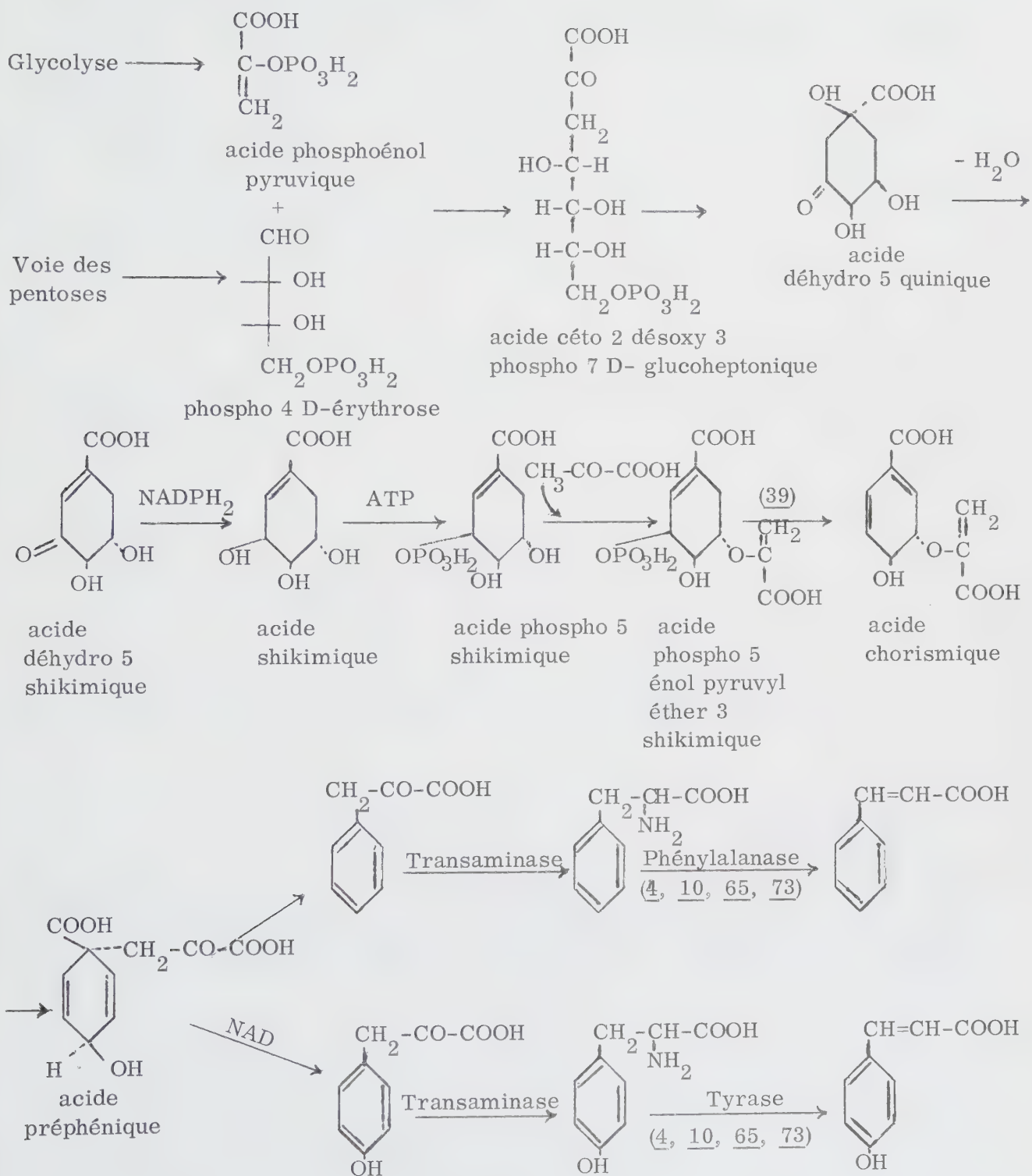


Tableau biogénétique des unités $\text{C}_6\text{-C}_3$
 RICHARDS (113), SCHMIDT (119) et PRIDHAM (109).

WATKIN, UNDERHILL et NEISH (137) ont également administré de la phényl alanine, de la phloroglucine et du méso-inositol inerte avec du $^{14}\text{CO}_2$ et ont obtenu les résultats suivants :

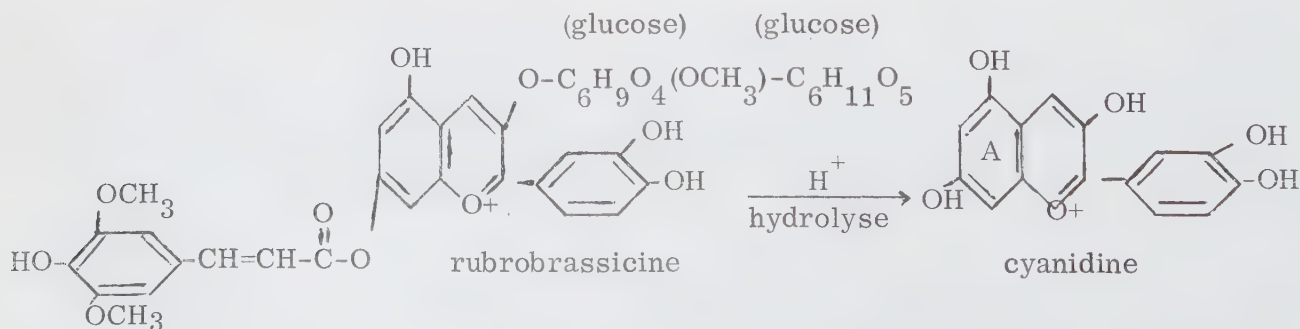
Composés administrés par g de poids sec	radioactivité de la quercétine $\text{m}\mu\text{c}/\text{mM}$	radioactivité mesurée dans les divers fragments, radioactivité de la quercétine = 100		
		noyau A	noyau C+C ₂	C ₃ +C ₄
$^{14}\text{CO}_2$ seul 635 μM 24,5 μc	610	91	95	142
$^{14}\text{CO}_2$ et 29 μM de phénylalanine inactive	56	248	22	0
$^{14}\text{CO}_2$ et 99 μM de phloroglucine	70	93	106	102

La phloroglucine ne semble pas s'incorporer rapidement dans le cycle A, alors que la phénylalanine donne bien naissance aux cycles B et C.

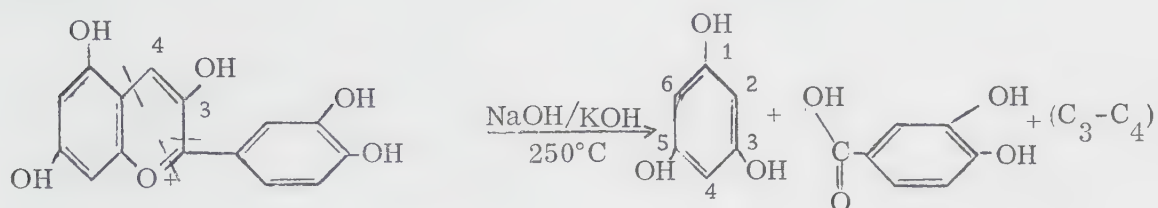
Signalons également que GEISSMAN et SWAIN (38) ont montré l'incorporation de la phénylalanine (^{14}C)-2 dans la rutine (rhamno-glucosyl-3 quercétine) et prouvé, après hydrolyse de la rutine, que la radioactivité était bien localisée dans la quercétine.

2.1.3. Biosynthèse du noyau A des anthocyanes à partir d'unité acétique (Hypothèse de BIRCH et DONOVAN).

En 1957, GRISEBACH (41) administre de l'acétate de sodium (^{14}C)-1 puis (^{14}C)-2 à des jeunes plants de choux rouges et isole un glucoside acylé de la cyanidine, la rubrobrassicine, qui, après hydrolyse, donne de la cyanidine radioactive.



GRISEBACH recherche, dans le cycle A, la position des atomes ^{14}C . Il dégrade, par fusion alcaline, la cyanidine en phloroglucinol et acide protocatéchique.



Il mesure la radioactivité de la phloroglucine et la dégrade en vue de recueillir les carbones 1, 3, 5, porteurs des hydroxyles, et les carbones 2, 4, 6. La radioactivité de ces carbones, sous forme de carbonate de baryum, est déterminée.

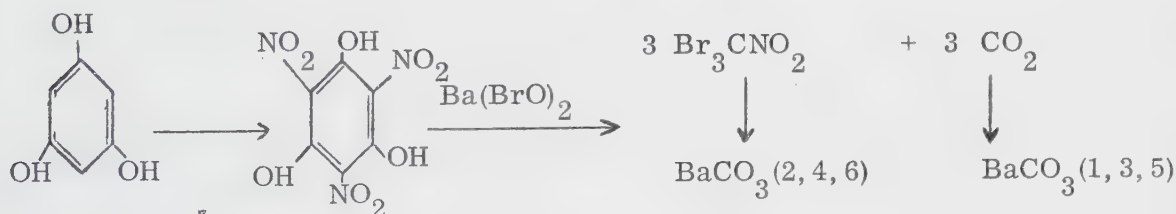
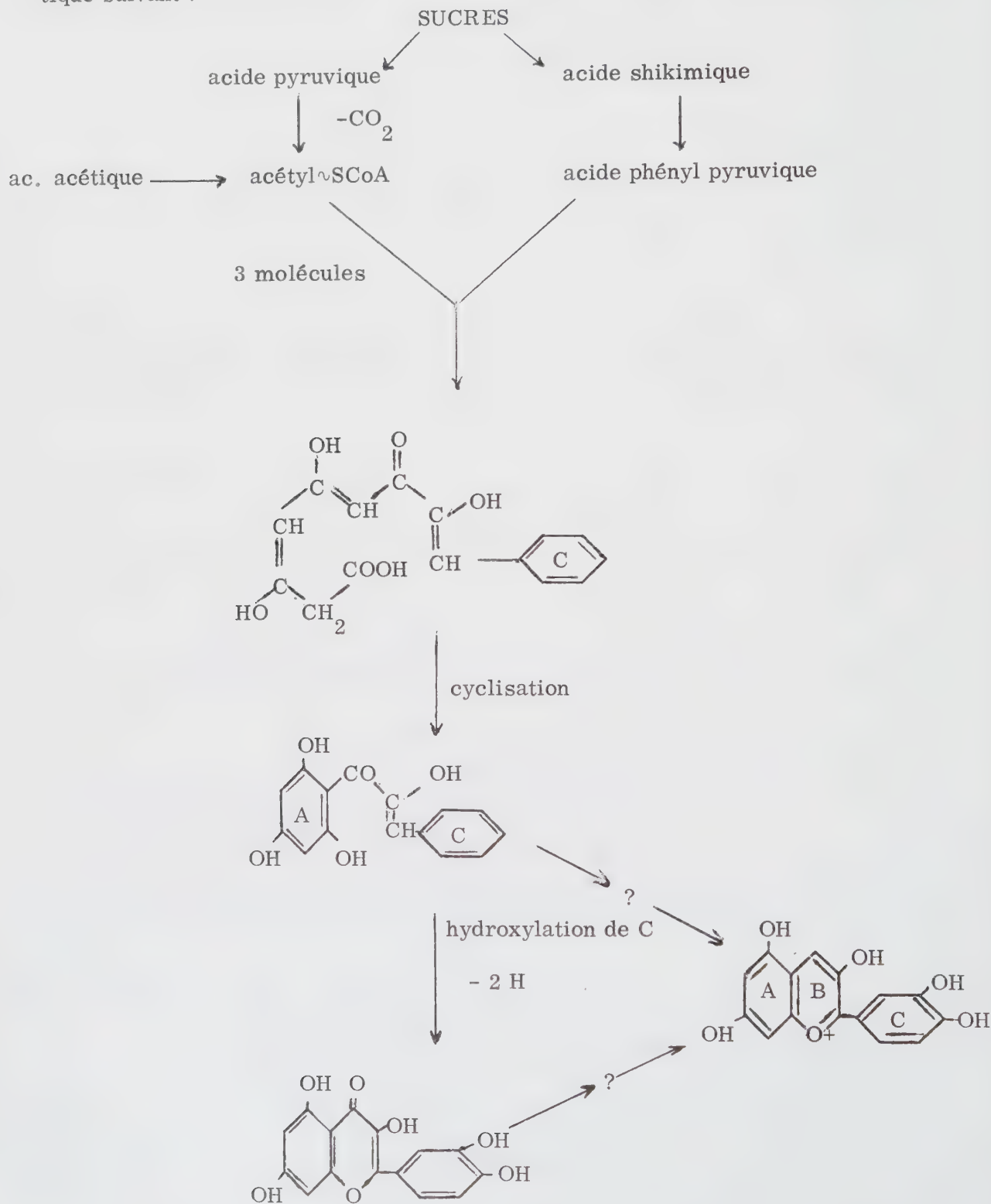


Schéma de dégradation de la phloroglucine.

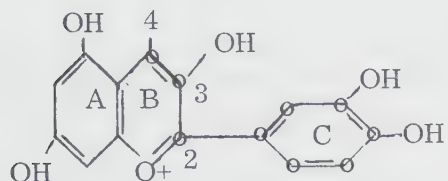
GRISEBACH obtient les résultats suivants :

	Expérience faite à partir de $\text{CH}_3\text{-}^{14}\text{COONa}$		Expérience faite à partir de $^{14}\text{CH}_3\text{-COONa}$	
	impulsions/ mn/mM	radioactivité mesurée par rapport à la trinitro- phloroglucine	impulsions/ mn/mM	radioactivité mesurée par rapport à la trinitro- phloroglucine
trinitro- phloroglucine	836 ± 18	100	1285 ± 26	100
Br_3CNO_2 (2, 4, 6)	16 ± 5	2	1071 ± 25	83
C (1, 3, 5)		98		17

Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse émise par BIRCH et DONOVAN (8). A la suite de ce travail, GRISEBACH (42) donne le tableau biogénétique suivant :



L'année suivante, GRISEBACH (43) montre que les noyaux B et C de la cyanidine peuvent être synthétisés à partir de la phényl-alanine. En effet, en administrant cette unité C_6-C_3 uniformément marquée et en dégradant la cyanidine obtenue, les atomes de carbone du noyau C et les carbones 2, 3, 4 du noyau B sont radioactifs.

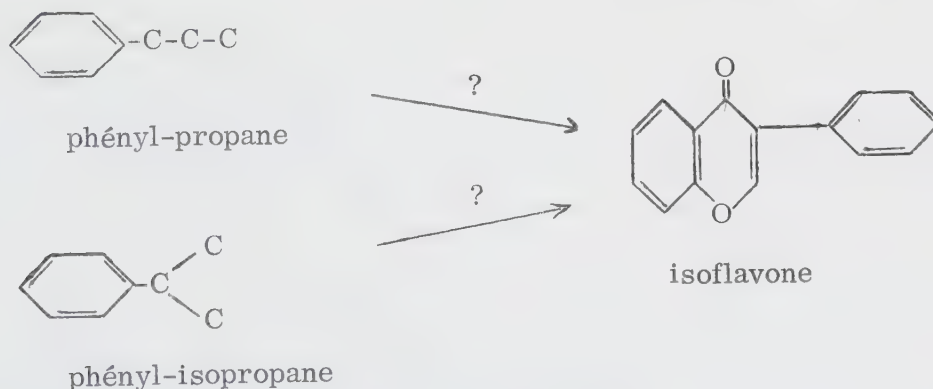


o atomes de carbone radioactifs
de la phénylalanine

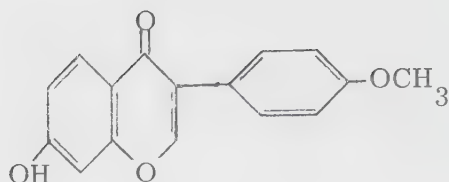
Une preuve d'incorporation d'unité C_6-C_3 dans le squelette des anthocyanes est ainsi apportée.

2.1.4. Biosynthèse des isoflavones à partir de précurseurs C_6-C_3 .

A la suite des travaux précédents, il était intéressant de savoir si les isoflavones ou phényl-3 chromones dérivent d'une unité type phényl-propane ou phényl-isopropane (82).

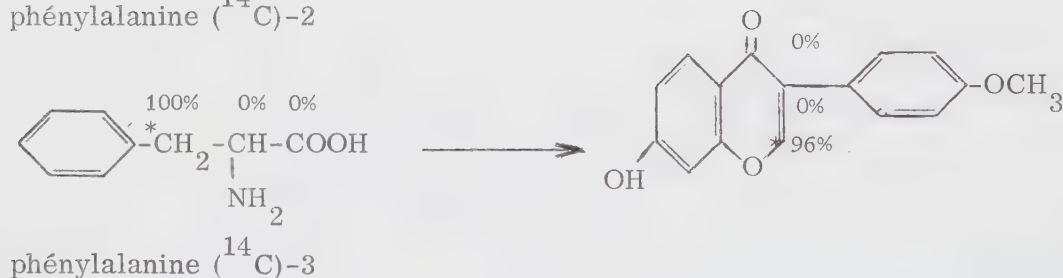
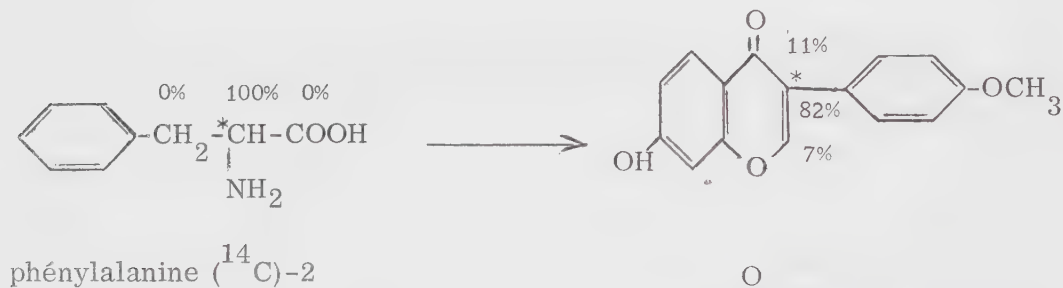
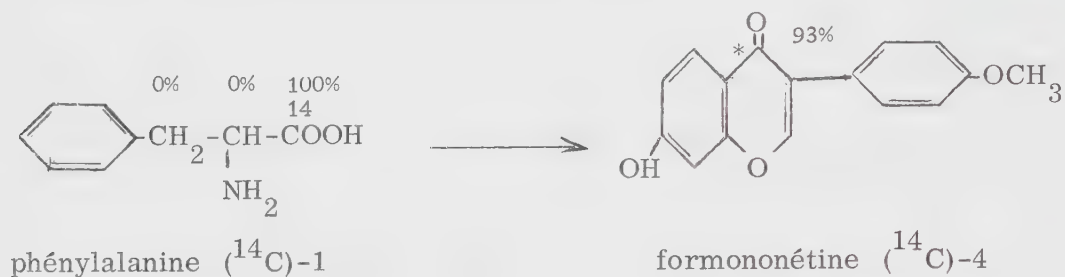


De nombreux auteurs, GEISSMAN et HINREINER (37), WHALLEY (140), ont suggéré une migration du phényle au cours de cette biosynthèse. Pour vérifier cette théorie, GRISEBACH (50) administre à du trèfle rouge (*Trifolium pratense*), particulièrement riche en formononétine ou méthoxy-4' hydroxy-7 isoflavone, de la phénylalanine successivement marquée en 1, 2 et 3 ;



formononétine

par dégradation de cette isoflavone devenue radioactive, il démontre qu'il y a bien migration du phényle. Les résultats obtenus sont les suivants :

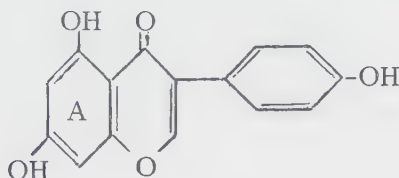


Une expérience faite à l'aide de l'acide cinnamique(¹⁴C)-2 donne les mêmes résultats : la formononétine isolée est surtout marquée sur le carbone 3.

C'est à la suite de ces résultats que GRISEBACH a donné le tableau biogénétique signalé au paragraphe 1.9.

Signalons que MITSUKUSHI, KANEKO et SASAKI (87), après les travaux de GRISEBACH, trouvent les mêmes résultats pour la biogénèse de la génisté-

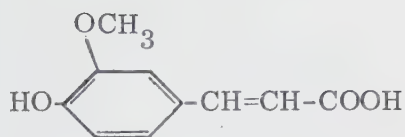
ine (trihydroxy-5, 7, 4' isoflavone) dont le cycle A est du type phloroglucinol, en administrant de la phényl-alanine à du trèfle rouge (Trifolium pratense).



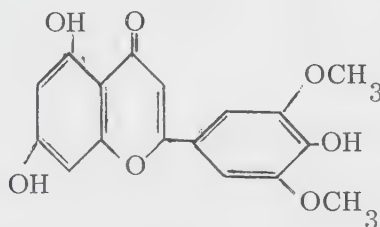
génistéine

2.1.5. Incorporation d'unités C_6-C_3 dans les flavones.

REZNIK et URBAN (112) ont montré que l'acide férulique β ^{14}C s'incorpore dans la tricine (diméthoxy-3', 5' trihydroxy-5, 7, 4' flavone) dans le blé.



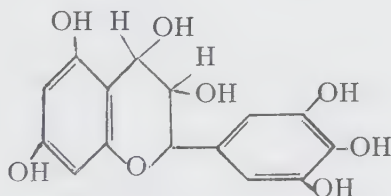
acide férulique



tricine

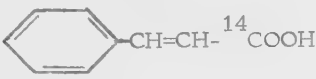
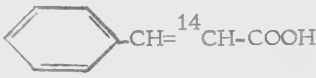
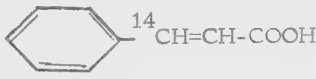
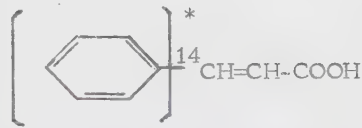
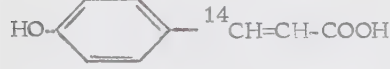
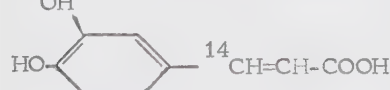
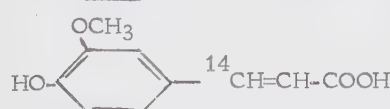
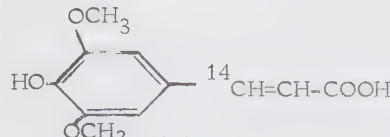
2.1.6. Incorporation de la phénylalanine chez les leucoanthocyanes.

LEBRETON (76) a montré que la phénylalanine (^{14}C)-3 s'incorpore faiblement dans la leucodelphinidine (pentahydroxy-5, 7, 3', 4', 5' flavanediol-3, 4), chez le houblon (Humulus lupulus L.), sans cependant localiser la radioactivité dans cette molécule.

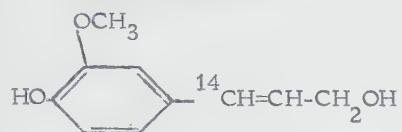


leucodelphinidine

Tableau récapitulatif des différentes unités C_6-C_3 radioactives
incorporées dans les pigments flavoniques ou anthocyaniques.

Unités C ₆ -C ₃ radioactives administrées	Composés flavoniques ou anthocyaniques marqués		matériau utilisé	Biblio- graphie
	désignation	groupe		
I - <u>Acides cinnamiques</u>				
	quercétine	flavonol	<u>Fagopyrum tataricum</u>	(130)
	quercétine	flavonol	<u>Fagopyrum tataricum</u>	(130)
	quercétine	flavonol	<u>Fagopyrum tataricum</u>	(130)
	quercétine, kaempférol, galangine	flavonols	<u>Prunus avium</u>	(23)
	d-catéchine	catéchine	<u>Prunus avium</u>	(25)
	cyanidine	anthocyane	<u>Brassica oleracea</u>	(46)
	formononétine biochanine A	isoflavones	<u>Cicer arietinum</u> <u>Trifolium pratense</u>	(44)
	quercétine	flavonol	<u>Fagopyrum tataricum</u>	(130)
	quercétine	flavonol	<u>Fagopyrum tataricum</u>	(130)
	quercétine	flavonol	<u>Fagopyrum tataricum</u>	(130)
	quercétine	flavonol	<u>Fagopyrum tataricum</u>	(130)
	tricine	flavone	blé	(112)
	quercétine	flavonol	<u>Fagopyrum tataricum</u>	(130)

II - Alcool cinnamique



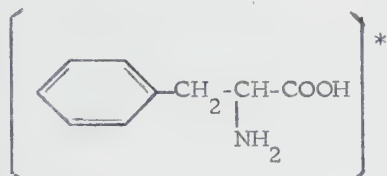
tricine

flavone

blé

(112)

III - Dérivés de la phénylalanine



quercétine

flavonol

Fagopyrum tataricum

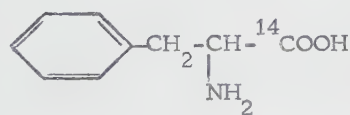
(130)

cyanidine

anthocyane

Brassica oleracea

(43)



quercétine

flavonol

Fagopyrum esculentum

(48)

formononétine,
biochanine A

isoflavones

Trifolium pratense
Cicer arietinum

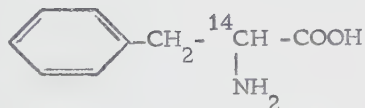
(45,50)

cyanidine

anthocyane

Brassica oleracea

(43)



formononétine,
biochanine A

isoflavones

Cicer arietinum

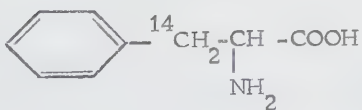
(45,50)

formononétine,
génistéine

isoflavones

Trifolium pratense

(50,87)



formononétine,
biochanine A

isoflavones

Trifolium pratense
Cicer arietinum

(45)
(44,50)

leucodelphinidine

leuco-
anthocyane

Humulus lupulus L.

(76)

* uniformément marqué

2.2. Les chalcones : composés intermédiaires dans la chaîne métabolique conduisant aux flavonoïdes.

2.2.1. Incorporation d'unité C_6-C_3 dans les anthocyanes, en présence de chalcone (unité $C_6-C_3-C_6$) inerte.

Si les chalcones sont des composés intermédiaires entre les unités C_6-C_3 et les flavonoïdes, l'incorporation d'une unité C_6-C_3 dans ces derniers, en présence de chalcone, doit être plus faible que celle obtenue avec l'unité C_6-C_3 seule. GRISEBACH et PATSCHKE (56) ont administré, à un jeune plant de chou rouge, de l'acide cinnamique (^{14}C)-3 seul et, à un deuxième plant, la même quantité d'acide cinnamique (^{14}C)-3, plus de la glucosyloxy-6' trihydroxy-4, 2', 4' chalcone inerte. La cyanidine des deux plants est isolée et sa radioactivité déterminée. Comme le montre le tableau ci-après, l'activité spécifique moléculaire de la cyanidine extraite du deuxième plant est plus faible que celle de la cyanidine du premier plant.

Composés administrés	activité de la cyanidine en cpm/mM
Acide cinnamique (^{14}C)-3 7,5 μM	487.200
Acide cinnamique (^{14}C)-3 7,5 μM + glucosyloxy-6' trihydroxy-4, 2', 4' chalcone 15 μM	225.300

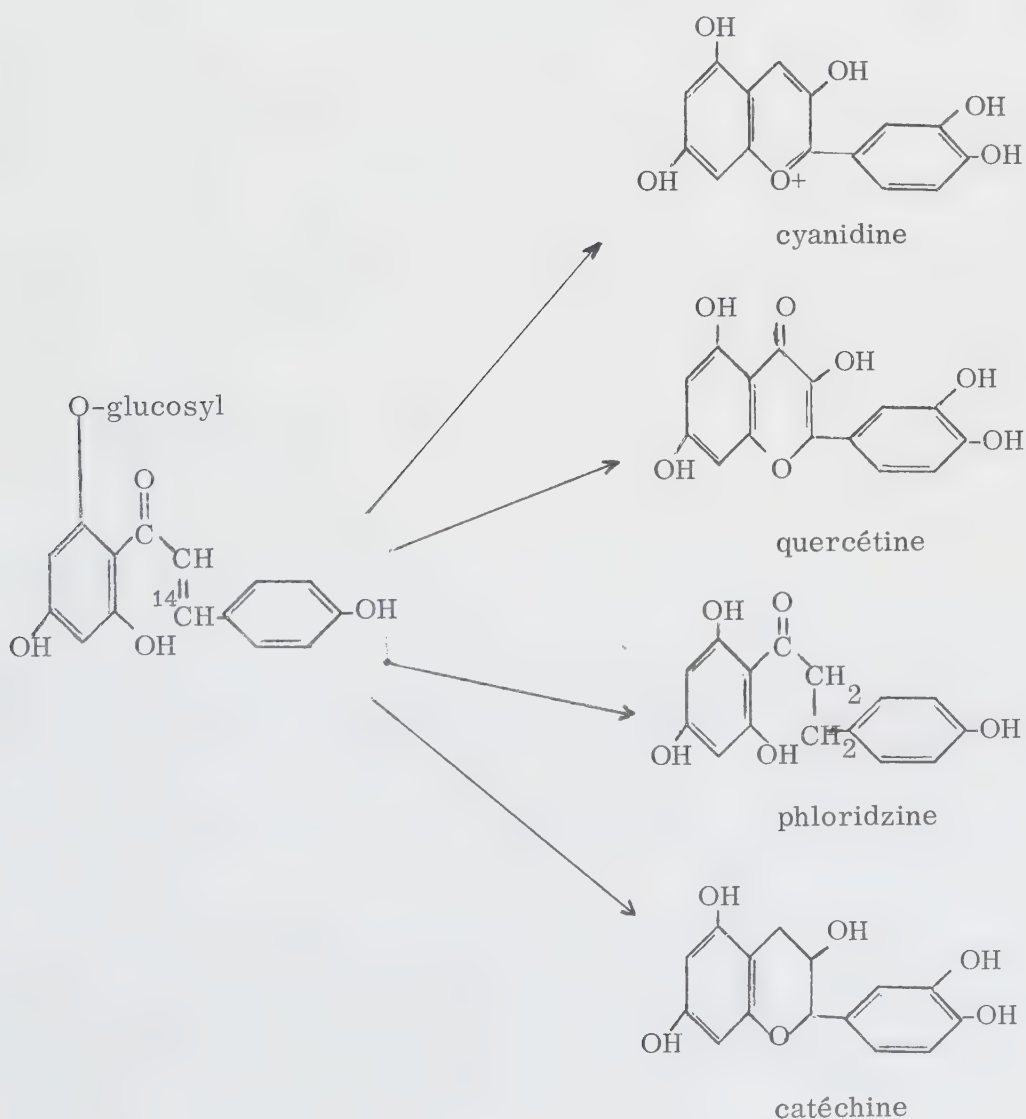
Ces résultats montrent qu'il y a eu compétition entre le glucoside de chalcone et l'acide cinnamique (^{14}C)-3, au cours de la synthèse de la cyanidine du chou rouge.

Depuis, de nombreuses expériences faites avec des chalcones ou des glucosides de chalcone radioactifs ont montré leur incorporation dans les flavonoïdes.

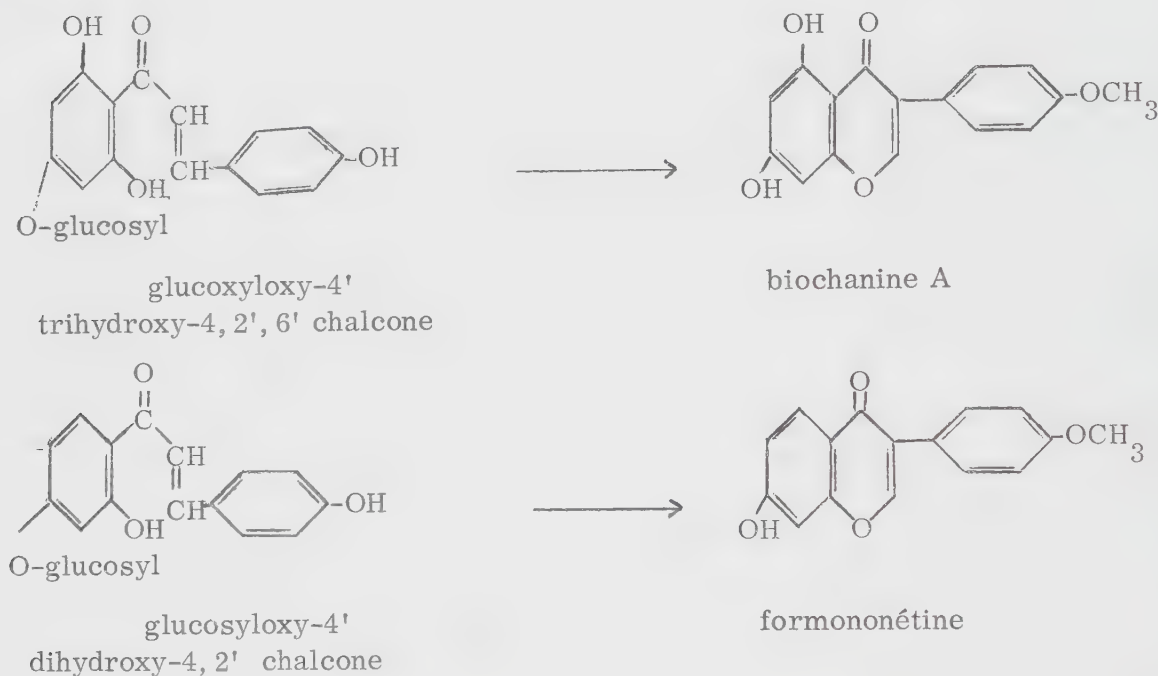
2.2.2. Transformation de chalcones marquées en flavonoïdes.

GRISEBACH et PATSCHKE ont montré l'incorporation de la glucosyloxy-6' trihydroxy-4, 2', 4' chalcone β (^{14}C) :

- dans la cyanidine, chez le chou rouge (56),
- dans la cyanidine et la quercétine, chez le sarrasin (*Fagopyrum esculentum*) (53)
- dans la phloridzine, chez une espèce de Malus (*Malus toringo*) (54),
- et dans la catéchine, dans le thé (*Thea sinensis*) (104).



GRISEBACH et BRANDNER (49) ont également démontré l'incorporation, chez le pois chiche (*Cicer arietinum*), de la glucosyloxy-4' trihydroxy-4, 2', 6' chalcone β (^{14}C), dans la biochanine A (dihydroxy-5, 7 méthoxy-4' isoflavone), tandis que la glucosyloxy-4' dihydroxy-4, 2' chalcone β (^{14}C) s'incorpore surtout dans la formononétine (hydroxy-7 méthoxy-4' isoflavone) et très peu dans la biochanine A.

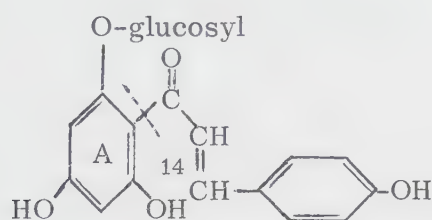


De telles expériences soulignent le rôle important des chalcones, ou de leurs glucosides, dans la biogénèse des dérivés flavoniques.

Cependant, dans l'expérience précédente, GRISEBACH et BRANDNER (49) ont également obtenu un peu de formononétine radioactive avec la glucosyloxy-4' trihydroxy-4, 2', 6' chalcone β (^{14}C) et un peu de biochanine A radioactive à partir de la glucosyloxy-4' dihydroxy-4, 2' chalcone β (^{14}C). Récemment, PATSCHKE, HESS et GRISEBACH (105) ont montré que les chalcones (ou leurs glucosides) peuvent être partiellement dégradées.

En outre, ils ont démontré l'incorporation possible de la glucosyloxy-6' trihydroxy-4, 2', 4' chalcone β (^{14}C) (le noyau A de cette chalcone dérive du phloroglucinol), dans les anthocyanes du chou rouge et des pétunias (*Petunia hybrida*), possédant un noyau A du type phloroglucine, ce qui semble tout à fait normal. Par contre, la même expérience, faite avec la glucosyloxy-4' dihydroxy-4, 2' chalcone

(le noyau A de cette chalcone étant du type résorcinol), permet d'obtenir ces mêmes anthocyanes radioactifs. De plus, en injectant la glucosyloxy-6' trihydroxy-4, 2', 4' chalcone β (^{14}C) à des plants de choux rouges et à des pétunias, ils ont pu isoler dans ces plants, les acides para-coumarique, férulique et sinapique radioactifs et, dans le cas de l'acide para-coumarique, ils ont montré que l'atome radioactif était bien en β .



glucosyloxy-6'
trihydroxy-4, 2', 4' chalcone

De tels résultats indiquent qu'il y a coupure de la chalcone entre le carbonyle et le noyau aromatique A et, comme le signale GRISEBACH, une transacylation est possible.

3. CONCLUSION

De cette étude bibliographique, nous pouvons dégager les faits et hypothèses suivants :

3.1. Il est probable qu'une unité $\text{C}_6\text{-C}_3$ est précurseur des flavanones et des flavanols, mais, au moment où nous avons commencé notre travail, aucune expérience n'avait encore vérifié cette hypothèse.

3.2. Avec COMTE, nous avons obtenu, chez Prunus avium, les résultats partiels suivants :

- une hydroxylation possible du noyau C au cours de la biosynthèse des flavonols.
- l'absence d'interrelation entre les pigments type flavonique et les pigments type anthocyanique, résultat confirmé par LEBRETON chez Humulus lupulus L (76) et en accord avec les expériences faites sur les mutants d'Antirrhinum et de Pharbitis (122).

- la comparaison des activités d'une fraction globale qui contient des glucosides de flavonoïdes d'une part et d'une fraction qui contient des aglycones libres d'autre part, en fonction du temps, suggère la formation, en premier lieu, des glucosides flavoniques.

3.3. Un intermédiaire de la chaîne métabolique (Unité $C_6-C_3 \longrightarrow$ composés flavoniques) pourrait être une chalcone. Les flavanonols, en particulier, pourraient être formés suivant le schéma :



A la suite de ces données, nous avons été amenés :

- 1/ à vérifier l'incorporation des unités C_6-C_3 , telles que l'acide cinnamique, l'acide phénylpyruvique, dans les flavanones et les flavanonols.
- 2/ à chercher si la possibilité d'hydroxylation en 3 des flavanones est réalisable "in vivo".
- 3/ à vérifier si l'hydroxylation du noyau C dans la série des flavanonols s'effectue dans le même sens que celle obtenue avec les flavonols de Prunus avium.
- 4/ enfin, sur des composés bien définis, à montrer si les glucosides flavoniques sont formés avant leurs aglycones correspondantes.

CHAPITRE II

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES COMPOSES FLAVONIQUES

=====

1. INTRODUCTION

Au cours de nos études biogénétiques, nous avons utilisé trois espèces végétales : Prunus avium, Robinia pseudoacacia, et Prunus Mahaleb.

1.1. Prunus avium (merisier).

Avec MENTZER et PACHECO (85), nous avons étudié plus particulièrement les constituants flavoniques du bois de cœur de merisier. Au cours de ces recherches, nous avons isolé douze composés flavoniques du bois de cœur et, parmi ces douze composés, sept ont été identifiés. L'étude de ces constituants a été poursuivie par CHOPIN, MOLHO, MENTZER, PACHECO (21, 100) et par HASEGAWA (61). A l'heure actuelle, près d'une vingtaine de composés flavoniques ont été déterminés chez cette espèce.

1.2. Robinia pseudoacacia.

Dans le bois de Prunus avium, les flavanones et les flavanonols étaient en quantité très faibles surtout chez les jeunes plants (dépourvus de cœur) qui ont servi à faire nos études biogénétiques ; nous avons donc recherché une espèce particulièrement riche en flavanonols, ce qui est le cas du Robinia pseudoacacia. En effet, selon FREUDENBERG (33), cette espèce renferme jusqu'à 5,3 % (par rapport à la poudre de bois de cœur) de dihydrorobinétine (tétrahydroxy-7, 3', 4', 5' flavanonol) ; ROUX et PAULUS (117) qui ont fait une analyse approfondie des constituants flavoniques de cette plante, ont isolé, en particulier, la flavanone et le leucoanthocyane correspondant : la robtine (tétrahydroxy-7, 3', 4', 5' flavanone) et le tétrahydroxy-7, 3', 4', 5' flavanediol-3, 4.

Pour réaliser notre travail, il a été nécessaire de mettre au point une technique de fractionnement permettant d'isoler ces trois composés à l'état pur, afin d'entreprendre l'étude de leur biosynthèse.

1.3. Prunus Mahaleb.

Le Prunus Mahaleb qui a l'avantage de renfermer des flavanones et des flavanonols et leurs dérivés glucosylés en 7 a été retenu pour compléter l'étude biogénétique entreprise. Dans cette espèce, PACHECO a isolé : la naringénine, l'aromadendrine, la taxifoline, la prunine ou glucosyl-7 naringénine, la glucosyl-7 aromadendrine et la glucosyl-7 taxifoline.

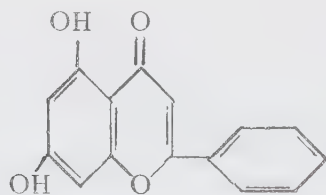
Dans ce cas, il nous a suffi de mettre au point une technique de microfractionnement au moyen de la chromatographie sur papier, ce qui nous a permis l'isolement de ces composés flavoniques à partir d'extraits provenant de jeunes plants.

Enfin, pour préciser la position de l'atome radioactif dans les molécules isolées à partir de chaque espèce, il a fallu étudier leur dégradation en les soumettant à l'épreuve de la fusion alcaline, décrite par MENTZER et MAURICE (89).

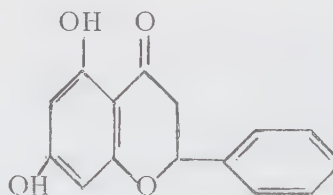
2. COMPOSES FLAVONIQUES CONTENUS DANS LE BOIS DU PRUNUS AVIUM (MERISIER).

2.1. Protocole expérimental de fractionnement.

Dès 1952, MENTZER et PACHECO (84) ont isolé et identifié, dans le cœur de cerisier, la chrysine (dihydroxy-5, 7 flavone) et la dihydrochrysine (dihydroxy-5, 7 flavanone).



chrysine



dihydrochrysine

Par la suite, nous avons poursuivi cette même étude sur le bois de merisier (Prunus avium) (85).

3 Kg de bois de cœur de merisier sont traités au moyen de 5 l. d'éther humide, dans un appareil d'extraction spécial, en acier inoxydable (*), pendant 3 jours. Après concentration de l'extrait étheré jusqu'à 500 ml, une quantité importante de chrysine se dépose sur les parois du récipient. Le précipité obtenu est filtré et recristallisé dans l'alcool. Dans les eaux-mères de cristallisation, il est possible d'isoler la dihydrochrysine.

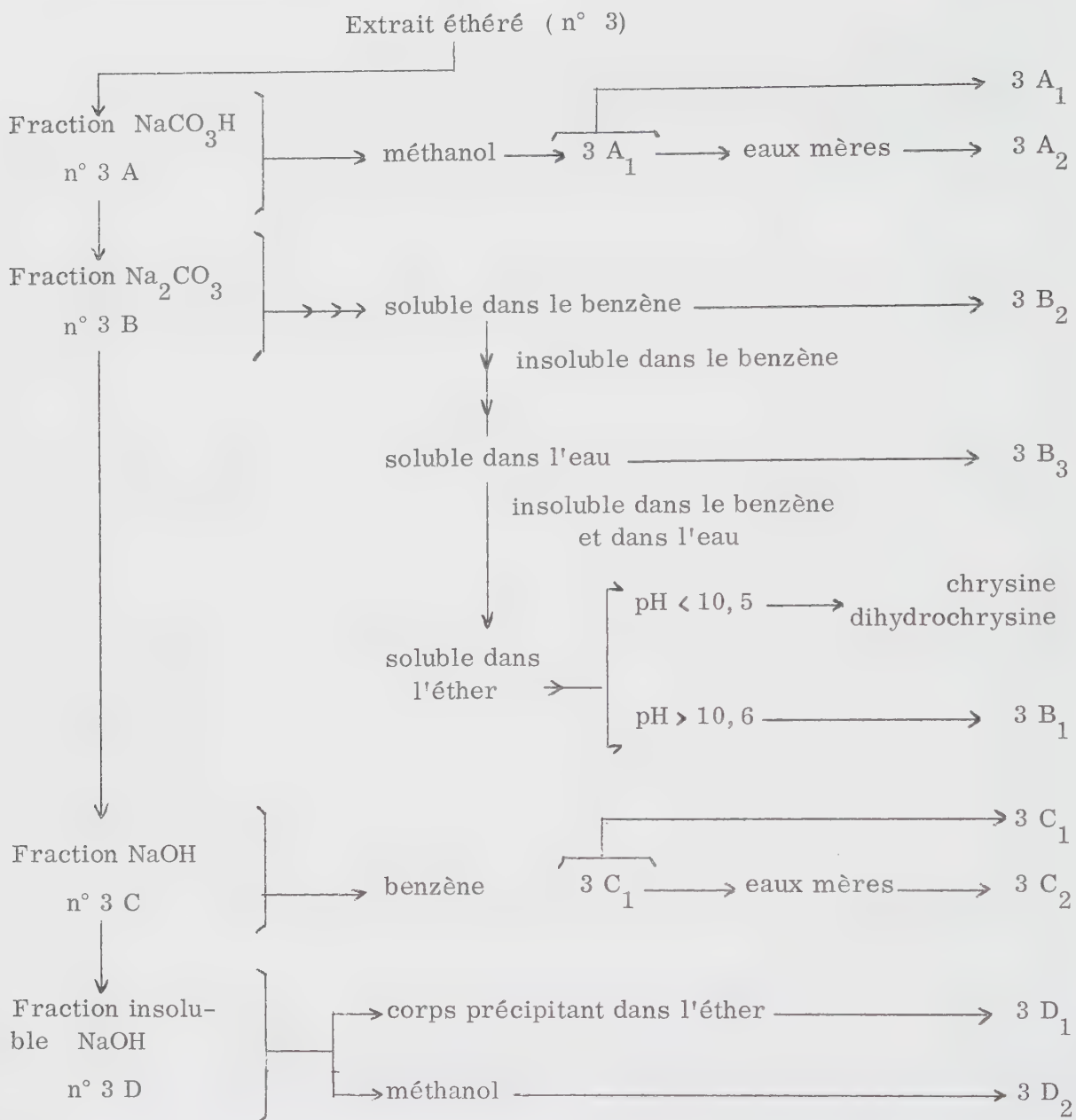
L'extrait étheré est épuisé plusieurs fois avec des mélanges tampons de pH de plus en plus élevé (voir schéma 1) ; cette opération aboutit à 4 fractions solubles dans lesquelles il est possible d'isoler 9 dérivés flavoniques.

- fraction soluble dans la solution de NaCO_3H à 5 % (fraction A)
- fraction soluble dans Na_2CO_3 à 10 % (fraction B)
- fraction soluble dans NaOH à 5 % (fraction C)
- fraction insoluble dans NaOH , restant en solution dans l'éther (fraction D)

La poudre de bois, privée de substances éthéro-solubles, est ensuite épuisée à l'acétone, à froid (extrait 3 Z).

(*) Nous remercions Monsieur CHEDIN qui a bien voulu mettre cet appareil à notre disposition.

Schéma 1



Extrait acétonique (N° 3 Z)



2.2. Etude des corps isolés.

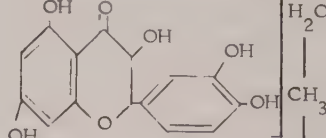
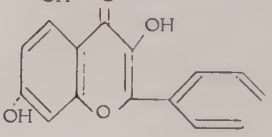
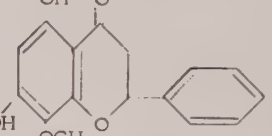
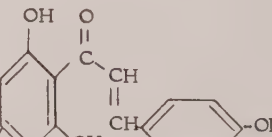
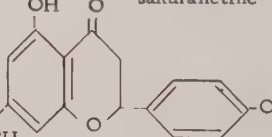
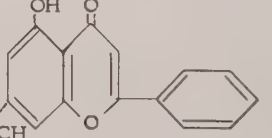
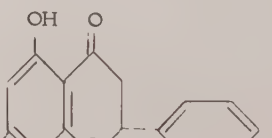
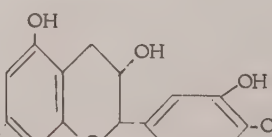
Sur les corps isolés, les déterminations des constantes physiques et chimiques suivantes ont été effectuées :

- P.F. (point de fusion instantanée au bloc Maquenne),
- Spectre d'absorption (nous ne disposions pas, à l'époque, d'appareil pour déterminer le spectre infra-rouge),
- Analyse élémentaire (lorsque le composé était obtenu en quantité suffisante),
- Dosage des méthoxyles, par la méthode ZEISEL,
- Préparation des dérivés acétylés,
- Analyse papyrographique,
- Réactions colorées avec certains réactifs chimiques spécifiques.

Les caractéristiques physico-chimiques et analytiques de ces composés nous ont permis d'identifier certains d'entre eux, par comparaison avec un échantillon de référence ou avec les données de la littérature.

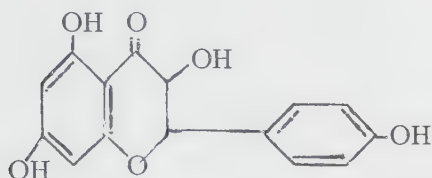
Les résultats obtenus ont été rassemblés dans le tableau n° 2.

Tableau n° 2

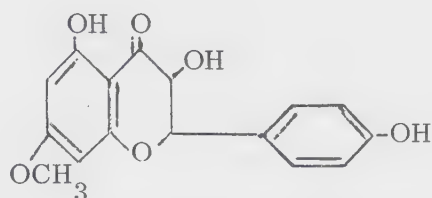
Réf. du composé	quantité obtenue	P.F. (Bloc Maquenne)	Chromatographie ac. acétique : A : W	Réactions colorées	Spectre U.V. C ₂ H ₅ OH=EtOH	Analyse élémentaire			Dosage des groupements méthoxyles	Dérivés Caractéristiques	formule	données fournies par la littérature.
						formule brute	calculé %	trouvé %				
3 A ₁	15 mg (0,005 %) cristaux blancs dans l'eau	153° C	Solvant A ₆₀ W ₄₀ R _f : 0,90 (orangé benzidine diazotée)	Mg+HCl : jaune puis rose HNO ₃ : gris puis rose	EtOH λ _{max} 285 mμ						peut-être une flavanone ? prunine ?	prunine trouvée par HASEGAWA (61) PF. Litt. 225° (70)
3 A ₂	50 mg (0,02 %) aiguilles blanches dans l'alcool	236° C		Mg+HCl : rose Zn+HCl : rose	EtOH λ _{max} 290 mμ NaOH N/100 max 242,5 et 315 m	C ₁₆ H ₁₄ O ₇ , H ₂ O	C 57,14 H 4,8	C 57,14 H 5,01	tr. 0 %		sans doute flavanonol 	
3 B ₁	10 mg (0,003 %) cristaux jaunes dans l'alcool	max. obt. 210° C	Solvant A ₆₀ W ₄₀ R _f : 0,62 (fluorescence jaune U.V. + tache R _f : 0,83 chrysine à l'état de traces)	Mg+HCl : rose Zn+HCl : solution reste jaune NaCO ₃ H : fluorescence U.V. JAUNE très intense FeCl ₃ : brun	EtOH (267-270) λ _{max} et 360 mμ						sans doute galangine 	PF Litt. 216° (70) EtOH λ _{max} 267,5 et 360 mμ (68)
3 B ₂	1,2 g (0,4 %) aiguilles jaune-pâle dans le benzène	152° C		FeCl ₃ : brun gris Mg+HCl : jaune or	EtOH λ _{max} 290 et 340 mμ NaOH N/100 λ _{max} 325 mμ	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	C 67,12 H 4,93	C 67,05 H 5,16	tr. 10,7 % calc. pour un OCH ₃ par mole 10,9		flavanone 	structure de cette nouvelle flavanone déterminée par CHOPIN, MOLHO, PACHECO et MENTZER (20)
3 B ₃	50 mg (0,02 %) aiguilles blanches dans l'alcool	225° C	Solvant A ₁₅ W ₈₅ R _f : 0,62 (fluorescence violette en U.V.)		EtOH λ _{max} 292 mμ NaOH N/100 λ _{max} 240 et 315 mμ	C ₁₆ H ₁₄ O ₇	C 60,38 H 4,43	C 60,32 H 4,72	tr. 0 %	fusion alcaline selon la technique de MAURICE et MENTZER (80) ; mise en évidence de la phloroglucine	corps très voisin de 3 A ₂	
3 C ₁	4 g (1,3 %) cristaux bruns dans le benzène	184° C	Solvant A ₆₀ W ₄₀ R _f : 0,70 (tache jaune avec NaOH 5 %, brune en U.V.)	Mg+HCl : lilas HNO ₃ : indigo FeCl ₃ : faible coloration brune NaOH 5% : brun rouge	EtOH λ _{max} 370 mμ	C ₁₆ H ₁₄ O ₅ , H ₂ O	C 63,15 H 5,3	C 63,41 H 5,3	tr. 11,4 % calc. pour un OCH ₃ par mole 10,9 %	par chauffage au-dessus du PF (220°), on obtient un corps qui cristallise en oursins blancs, dans le benzène, F. 153°. <u>Analyse :</u> Tr. C% 67,26 - H% 4,98 Calc. pour C ₁₆ H ₁₄ O ₅ C% 67,12 - H% 4,93 <u>Spectre UV :</u> EtOH λ _{max} 290 et 325 mμ corps identique à la sakuranétine, dihydroxy-5,4' méthoxy-7 flavanone. <u>Dérivé acétylé</u> , F. 145°. <u>Analyse élémentaire :</u> Tr. C% 64,62 - H% 4,86 Calc. pour C ₂₀ H ₁₈ O ₇ C% 64,86 - H% 4,90	chalcone 	trihydroxy-4,2',6' méthoxy-4' chalcone
3 C ₂	600 mg (0,2 %) oursins blancs dans le benzène	153° C	Solvant A ₆₀ W ₄₀ R _f : 0,77 (tache jaune avec NaOH 5 %)	Mg+HCl : lilas HNO ₃ : indigo	EtOH λ _{max} 290 et 325 mμ	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	C 67,12 H 4,93	C 67,20 H 4,96			corps identique à celui obtenu par cyclisation du corps 3 C ₁ sakuranétine 	F. litt. 153° (70) <u>Spectre UV :</u> EtOH 290 et 325 mμ
3 D ₁	7,5 g (2,5 %) aiguilles jaune-pâle dans l'alcool	163° C		FeCl ₃ : brun	EtOH λ _{max} 270 et 310 mμ	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	C 71,63 H 4,51	C 71,12 H 4,59	tr. 11,5 % calc. pour un OCH ₃ par mole 11,47%		tectochrysrine 	corps identique à la tectochrysrine obtenue par synthèse (PILLON et MENTZER, 107)
3 D ₂	1 g (0,3 %) paillettes blanches dans l'alcool	110° C		FeCl ₃ : brun Mg+HCl : jaune or HNO ₃ : bleu foncé	EtOH λ _{max} 290 mμ	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	C 71,10 H 5,22	C 70,92 H 5,21		Détermination du poids moléculaire par la méthode de RAST, tr. : 276 calc. pour C ₁₆ H ₁₄ O ₄ : 270 <u>Dinitro-2,4 phénylhydrazone :</u> aiguilles pourpres dans l'alcool, F. 277° <u>Analyse :</u> tr. N% 12,73 calc. pour C ₂₂ H ₁₈ O ₇ N ₄ N% 12,44	dihydrotectochrysrine ou pinostrobin 	corps identique à la dihydrotectochrysrine de synthèse, obtenue par MASSICOT PILLON et MENTZER (79)
3 Zéth1	10 g (3 %) aiguilles blanches dans l'eau	175° C	Solvant A ₆₀ W ₄₀ R _f : 0,52 (vert olive avec FeCl ₃ , puis violette avec Na ₂ CO ₃ 5 %)	FeCl ₃ : vert olive Mg+HCl : incolore	EtOH λ _{max} 280 mμ						d (+) catéchine 	corps identique à d (+) catéchine isolée et identifiée dans le cœur de <i>Prunus avium</i> par PACHECO, CRONENBERGER et MENTZER (100)



Outre la d (+) catéchine, PACHECO, CRONENBERGER et MENTZER (100) ont isolé par la suite, du bois de cœur de Prunus avium, un flavanonol, l'aromadendrine ou trihydroxy-5, 7, 4' flavanonol ; puis, CHOPIN et PACHECO (21) isolèrent la méthyl-7 aromadendrine.

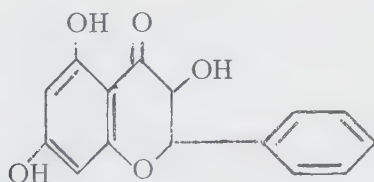


aromadendrine

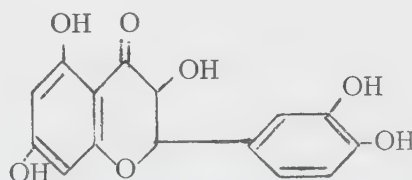


méthyl-7 aromadendrine

Grâce à un test mis au point par lui-même permettant d'identifier les flavanonols dans les extraits végétaux, PACHECO (93) a décelé dans les extraits de Prunus avium la présence de pinobanksine (dihydroxy-5, 7 flavanonol), d'aromadendrine et de taxifoline (tétrahydroxy-5, 7, 3', 4' flavanonol)

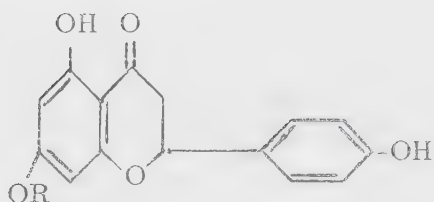


pinobanksine



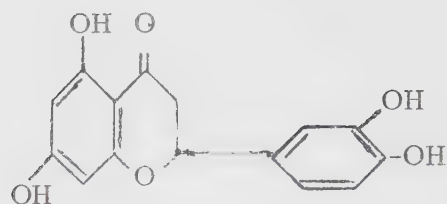
taxifoline

De son côté, en utilisant une méthode de fractionnement basée sur l'emploi de solvants de plus en plus polaires, HASEGAWA (61) a isolé, de poudre de bois de Prunus avium japonais, de la naringénine (trihydroxy-5, 7, 4' flavanone), de l'ériodictyol (tétrahydroxy-5, 7, 3', 4' flavanone), de la taxifoline, de la prunétine (dihydroxy-5, 4' méthoxy-7 isoflavone), de la génistéine (trihydroxy-5, 7, 4' isoflavone), de l'aequinoctine (glucosyl-7 chrysine), de la génistine (glucosyl-7 génistéine) et de la prunine (glucosyl-7 naringénine).

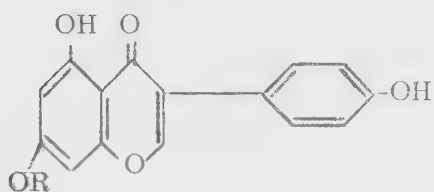


R = H, naringénine

R = glucosyle, prunine

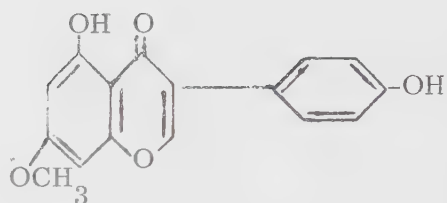


ériodictyol



R = H, génistéine

R = glucosyle, génistine



prunétine

3. COMPOSES FLAVONIQUES CONTENUS DANS LE BOIS DE ROBINIA PSEUDOACACIA.

3.1. Composés flavoniques isolés et identifiés dans le bois de Robinia pseudoacacia.

SCHMID et PIETSCH (118), puis BRASS et KRANZ (13) ont trouvé, dans le bois de Robinia, un flavonol, la robinétine (tétrahydroxy-7, 3', 4', 5' flavonol). En 1954, FREUDENBERG et HARTMANN (33) isolèrent le flavanonol correspondant, la dihydrorobinétine (tétrahydroxy-7, 3', 4', 5' flavanonol) et montrèrent que cet arbre renfermait jusqu'à 5,3 % de ce flavanonol, en partant de la poudre de cœur.

En utilisant la méthode dite de contre-courant ou méthode de CRAIG, ROUX et PAULUS (117) isolèrent, à partir d'un extrait méthanolique de poudre de cœur de Robinia pseudoacacia, 17 composés flavoniques et parmi ces 17 substances, en identifièrent 13. Ces auteurs ont également donné la teneur en flavonoïdes de la poudre d'aubier et de cœur de Robinia pseudoacacia. (voir tableau n° 3).

Tableau n° 3

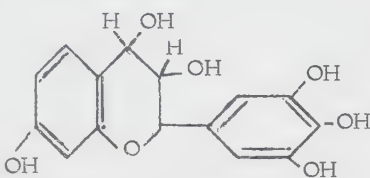
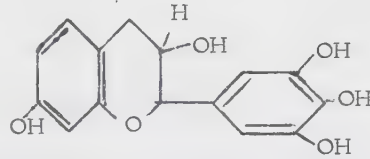
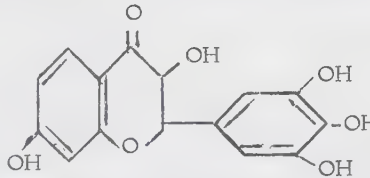
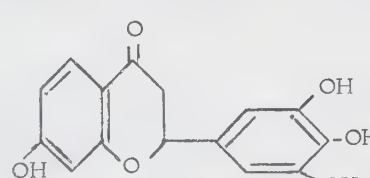
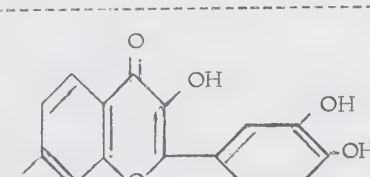
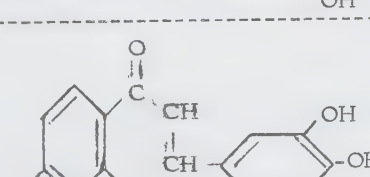
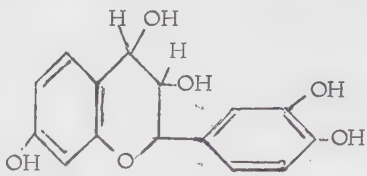
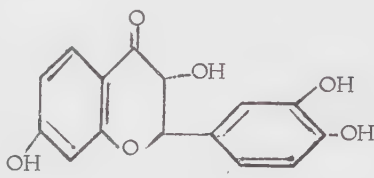
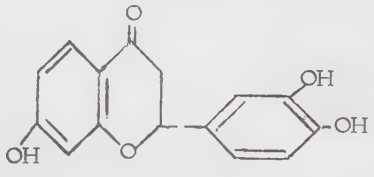
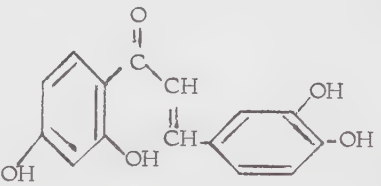
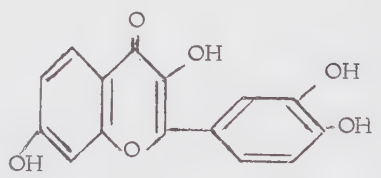
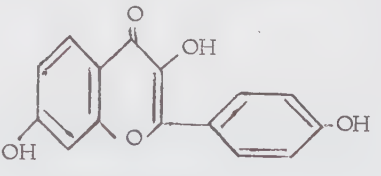
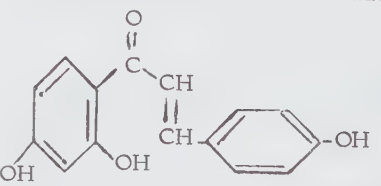
Nom	Nom chimique	Formule	concentration en % par rapport au poids de résidu sec obtenu après évaporation du méthanol	
			aubier	cœur
	(+) tétrahydroxy-7, 3', 4', 5' flavanediol-3, 4		0, 4	6, 2
(-) robinétinidol	(-) tétrahydroxy-7, 3', 4', 5' catéchine		-	-
(+) dihydro-robinétine	(+) tétrahydroxy-7, 3', 4', 5' flavanonol		2, 3	17, 6
(-)robtine	(-) tétrahydroxy-7, 3', 4', 5' flavanone		0, 05	1, 5
robinétine	tétrahydroxy-7, 3', 4', 5' flavonol		0, 8	8
robtéine	pentahydroxy-3, 4, 5, 2', 4' chalcone		absente	0, 9

tableau n° 3 suite

	(+) trihydroxy- 7, 3', 4' flavanediol-3, 4		absent	-
fustine	trihydroxy- 7, 3', 4' flavanonol		absente	0, 5
(-) butine	trihydroxy- 7, 3', 4' flavanone		absente	0, 5
butéine	tétrahydroxy- 3, 4, 2', 4' chalcone		absente	0, 4
fisétine	trihydroxy- 7, 3', 4' flavonol		trace	0, 01
	dihydroxy- 7, 4' flavonol			
	trihydroxy- 4, 2', 4' chalcone		absente	0, 01

3.2. Méthode de fractionnement mise au point pour isoler les flavonoïdes de Robinia pseudoacacia, nécessaire à notre étude biogénétique.

Les injections de molécules radioactives doivent être faites sur de jeunes plants, dépourvus de cœur, de souches différentes de celles analysées par les auteurs précédents ; il est donc nécessaire d'isoler la (+) dihydrorobinétine, la robtine, le (+) tétrahydroxy-7, 3', 4', 5' flavanediol-3, 4 et la robinétine, pour mettre en évidence leur présence dans l'aubier et pour réaliser ultérieurement l'étude biogénétique envisagée.

3.2.1. Extraction et fractionnement.

2 Kg de poudre de tronc de jeunes plants, âgés de 5 ans, de Robinia pseudoacacia, sont extraits à froid par 6 litres de méthanol ; après 3 jours, cette solution est filtrée, puis concentrée à sec : poids du résidu sec, 71 g (soit 3, 75 %).

La poudre brune obtenue est épuisée trois fois par 20 ml d'éther qui, évaporé sous vide, donne un résidu brun clair : 27 g.

Ce solide est repris par 100 ml d'eau bouillante ; l'insoluble est filtré et la solution déposée sur une colonne de cellulose BW 200, de 65 mm de diamètre et de 700 mm de hauteur. En utilisant l'eau distillée comme solvant d'élution, 200 fractions de 25 ml sont recueillies. Leur composition est analysée à l'aide de la chromatographie sur papier.

- les fractions 3, 4 et 5 contiennent uniquement le tétrahydroxy-7, 3', 4', 5' flavanediol-3, 4 - R_f 0, 63 dans A_2W_{98} .

- dans les fractions 9 à 15, un corps cristallise spontanément ; il s'agit de la dihydrorobinétine - R_f 0, 67 dans butanol saturé d'eau.

- les fractions 16, 17, 18 contiennent un mélange de dihydrorobinétine et de fustine, de R_f respectifs dans butanol saturé d'eau : 0, 67 et 0, 82.

- les fractions 24 à 35 contiennent la robtine, R_f 0, 25 dans A_2W_{98} .

- Enfin, dans les fractions 170 à 190, un peu de robtine est mise en évidence.

La robinétine, visible sur la colonne sous forme d'anneau jaune, ne se déplace que très lentement ; il est possible de l'éluer avec un solvant plus organique, tel que acide acétique-eau (60:40).

3.2.2. Identification des substances isolées.

Les substances isolées sont identifiées :

- par leurs constantes physico-chimiques : P.F., spectre U.V., chromatographie, réactions colorées,
- par dégradation alcaline,
- par comparaison des substances isolées avec des corps de référence (*).

Les résultats trouvés sont mentionnés sur le tableau n° 4 ci-après.

(*) Nous remercions Monsieur le Professeur D.G. ROUX pour l'échantillon de tétrahydroxy-7, 3', 4', 5' flavanediol-3,4 et Mademoiselle M. CHADENSON (17) pour les échantillons de fisétine (trihydroxy-7, 3', 4' flavonol) et de robinétine que ces auteurs nous ont gracieusement fournis.

CARACTERISTIQUES DES COMPOSES ISOLEES
CHEZ ROBINIA PSEUDOACACIA.

Tableau n° 4

Composé	P.F. Bloc Maquenne		Spectre U.V. dans l'alcool				Réactions colorées	
	trouvé	litté.	trouvé		littérature		trouvé	corps de référence
			max m μ	log ϵ	max m μ	log ϵ		
tétrahydroxy- 7, 3', 4', 5' flavannediol- 3, 4	172° C	172- 175° C	280	3,56	280,5	3,56	HCl : rouge violet	HCl : rouge violet
dihydro- robinétine	225° C	225° C	276 326		276 326		FeCl ₃ : gris bleu Zn+HCl : bleu Mg+HCl : bleu violet	
robtine	275° C	276° C	234 276 311		234 276 311		FeCl ₃ : gris bleu Zn+HCl : inco- lore Mg+HCl : bleu	
Robtéine					255 310 inflexion 387			

Tableau n° 4 suite

Chromatographie sur papier Whatman 4 révélateur : ac. sulfanilique diazoté puis exposition du chroma- togramme aux vapeurs d'ammoniac				Composés obtenus par transformations chimiques du corps isolé	quantité obtenue
solvant : butanol saturé d'eau -BW		Solvant : A ₂ W ₉₈			
R _f corps isolé	R _f subst. de réf.	R _f corps isolé	R _f subst. de réf.		
0,28	0,28	0,67	0,67	Par chauffage à l'ébullition, pendant 5 minutes, dans un mélange HCl 3N -n-propanol (1:2 en volume), la solution alcoolique devient rouge violacée. Ce pigment donne un R _f 0,45 dans HCOOH - HCl 3N (1:1) La même réaction effectuée sur l'échantillon de référence donne un spot de même couleur et de même R _f	16 mg aiguilles blanches dans l'eau
0,61		0,48		Par oxydation avec une solution aqueuse de NaSO ₃ H à 10 % (64) portée à l'ébullition pendant 3 h., ce corps donne une substance jaune dont les propriétés sont identiques à celles de la robinétine.	11 g aiguilles blanches dans l'eau
0,76		0,22		Par micro-fusion alcaline (80), il est possible d'identifier, par chromatographie sur papier, la résorcine et l'acide gallique.	30 mg cristaux en forme de losange dans l'eau
				Ce corps n'a pu être isolé à l'état pur ; par chromatographie sur papier dans butanol-eau, une tache brune en U.V. très importante est obtenue, R _f 0,64 (R _f obtenu par ROUX 0,63) L'élution de cette bande dans l'alcool donne un spectre U.V. λ max 255 et 385 mμ , avec inflexion à 310 mμ (Spectre obtenu par ROUX λ max 255 et 387 mμ , inflexion à 310 mμ).	10 mg corps impur

4. PRUNUS MAHALEB.

4.1. Composés flavoniques isolés de Prunus Mahaleb.

PACHECO, BRACHET et GROUILLER (94, 96, 98, 101) isolèrent et identifièrent 8 composés flavoniques dans la poudre de bois de Prunus Mahaleb :

la naringénine, l'aromadendrine, la taxifoline (97), la génistéine, la prunétine, la prunine, la glucosyl-7 aromadendrine, la glucosyl-7 taxifoline.

Nous n'avons pas approfondi cette étude analytique, mais nous avons mis au point une méthode d'isolement de ces composés, à partir de faibles quantités d'extrait brut.

4.2. Méthode de fractionnement utilisée pour isoler les composés flavoniques de Prunus Mahaleb.

L'extrait alcoolique de Prunus Mahaleb est concentré à sec et la poudre obtenue extraite plusieurs fois à l'éther, de manière à solubiliser les aglycones (naringénine, aromadendrine, taxifoline, génistéine et prunétine) ; l'insoluble est ensuite dissous à chaud dans un mélange alcool-eau (50:50).

Chaque extrait éthéré et hydro-alcoolique est soumis à plusieurs chromatographies de partage sur papier, en identifiant les corps avec des substances de référence, selon la technique suivante :

L'extrait est déposé sous forme d'un trait sur une feuille de papier Whatman n° 1, longueur 40 cm (8 à 10 mg de substance sont en général déposés par feuille), des corps de référence purs sont déposés de part et d'autre. Le chromatogramme est développé; de chaque côté une bande est ensuite découpée suivant le sens de migration du solvant pour être révélée à l'acide sulfanilique diazoté à 0,1 % (une exposition aux vapeurs d'ammoniac est nécessaire pour obtenir des zones ou spots plus colorés). Les zones correspondant aux corps mis en évidence sont délimitées sur la partie non révélée de la feuille. Cette dernière est découpée et éluee avec de l'alcool chaud.

Les extraits alcooliques obtenus sont concentrés puis, de nouveau, chromatographiés selon le même processus, en utilisant un solvant de développement différent. Il faut en général effectuer trois chromatographies successives pour obtenir des corps purs.

Après bien des tâtonnements sur le choix des solvants de développement, nous avons retenu le processus suivant (voir tableaux n° 5 et 5').

Tableau n° 5

Fractionnement de l'extrait étheré (aglycones)

Composés		solvant 1	solvant 2	solvant 3	solvant 3'	solvant 4
Narin- génine	R _f de la zone de l'extrait	0,10	0,58	0,23		0,72
	R _f corps de référence	0,12	0,58	0,23		0,72
aroma- dendrine	R _f de la zone de l'extrait	0,33- 0,35	0,33		0,82	
	R _f corps de référence	0,33	0,33		0,82	
taxi- foline	R _f de la zone de l'extrait	0,33- 0,35	0,10		0,74	
	R _f corps de référence	0,35	0,10		0,74	

Solvant 1 : acide acétique-eau (2:98) A₂W₉₈

Solvant 2 : benzène-acide propionique-eau (2:2:1) BzPW

Solvant 3 : n-propanol-eau (15:85)

Solvant 3' : n-butanol-acide acétique-eau (70:18:12) B₇₀A₁₈W₁₂

Solvant 4 : acide acétique-eau (30:70) A₃₀W₇₀

Tableau 5'

Fractionnement de l'extrait hydro-alcoolique (glucosides).

Composé		solvant A	solvant B	solvant C
glucosyl-7 naringénine	R _f de la zone de l'extrait	0,55	0,44	0,62
	R _f corps de référence	0,56	0,44	0,62
glucosyl-7 aromadendrine	R _f de la zone de l'extrait	0,55	0,58	0,74
	R _f corps de référence	0,56	0,58	0,74
glucosyl-7 taxifoline	R _f de la zone de l'extrait	0,25	0,60	
	R _f corps de référence	0,25	0,59	
zone correspondant aux aglycones incomplètement extraites à l'éther		0,7- 0,85		

Solvant A : B₇₀A₁₈W₁₂

Solvant B : A₂W₉₈

Solvant C : A₁₅W₈₅

Le tableau n° 6 donne les caractéristiques spectrales dans l'U.V. (maximum d'absorption et densité optique) et quelques réactions colorées caractéristiques de ces composés.

Tableau n° 6

Spectres U.V. et réactions colorées des
composés flavoniques de Prunus Mahaleb

Composé	Spectre U.V. dans l'alcool		Réactions colorées			
	max m μ	log ϵ	FeCl ₃	Mg+HCl	Zn+HCl	Couleur de la tache révélée avec acide sulfanilique diazoté + NH ₃
glucosyl-7 taxifoline	284	3,97	gris vert	lilas	rouge violacé	brique
glucosyl-7 aromadendrine	283	4,17	brun	rouge	rouge	orangé rouge
prunine	284	4,30	brun	rouge	incolore	orangé
taxifoline	290	4,27	gris vert	lilas	rouge violacé	brique
aromadendrine	292	4,29	brun	rouge	rouge	orangé rouge
naringénine	269	4,23	brun	rouge	incolore	orangé

Les flavanonols et les glucosides de flavanonols obtenus sont ensuite oxydés en flavonols et glucosides de flavonols correspondants, par action d'une solution aqueuse à 10 % de NaSO₃H portée à l'ébullition pendant 3 heures (64).

L'étude faite avec ces nouveaux composés est résumée dans le tableau 7.

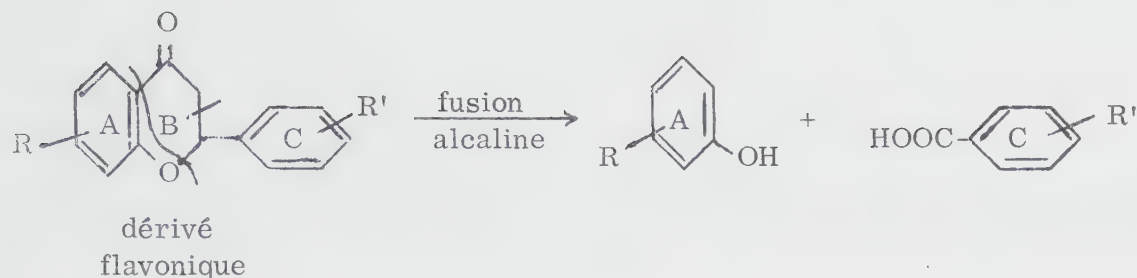
Tableau n° 7

Composé	spectre U.V. dans l'alcool		Chromatographie sur papier whatman n° 1			
	max m μ	log ϵ	solvant	R _f	R _f corps de réf.	révéla- teur
glucosyl-7 quercétine (quercimétrine)	257 372	4,38 4,33	B ₇₀ A ₁₈ W ₁₂	0,17	0,17	U.V. jaune
glucosyl-7 kaempférol (populnine)	265 325 367	4,19 3,94 4,22	B ₇₀ A ₁₈ W ₁₂	0,45	0,45	U.V. jaune
quercétine	257 370	4,31 4,32	A ₆₀ W ₄₀	0,30	0,30	U.V. jaune
kaempférol	266 367,5	4,22 4,32	A ₆₀ W ₄₀ BW	0,45 0,81	0,45 0,81	U.V. jaune

Ces différentes données nous permettront ultérieurement de déterminer la pureté des composés radioactifs isolés.

5. FUSION ALCALINE DES COMPOSES FLAVONIQUES.

MAURICE et MENTZER (80) ont montré qu'un dérivé flavonique, chauffé à 280° C, en présence d'une pastille de potasse, se dégrade. Il est possible de mettre en évidence par chromatographie sur papier le polyphénol correspondant au cycle A et l'acide benzoïque correspondant au cycle C.



Cette technique sera utilisée dans le cas des dérivés flavoniques radioactifs obtenus pour localiser l'atome radioactif. Il est donc nécessaire de préciser le comportement chromatographique et le spectre U.V. :

- de la résorcine et de l'acide gallique dans le cas des dérivés flavoniques de Robinia pseudoacacia,
- de la phloroglucine et des acides protocatéchique et parahydroxybenzoïque, dans le cas des pigments flavoniques de Prunus avium et de Prunus Mahaleb.

Cette étude est résumée dans le tableau n° 8

Tableau n° 8

Composé	spectre U.V. dans l'alcool		chromatographie		
	max mμ	log ε	solvant	R _f	couleur de la tache révélée à l'ac. sulfa- nilique diazoté + NH ₃
ac. gallique	260	3,87	A ₂ W ₉₈	0,48	brun
résorcine	276	3,36	A ₂ W ₉₈	0,74	jaune auréolé de rouge
acide p-hydroxy- benzoïque	247	4,09	B ₇₀ A ₁₈ W ₁₂	0,86	jaune
acide proto- catéchique	259	4,11	B ₇₀ A ₁₈ W ₁₂	0,78	saumon
phloroglucine	267	3,21	B ₇₀ A ₁₈ W ₁₂	0,63	jaune auréolé de rouge

6. CONCLUSION.

- 6.1. Du Prunus avium, nous avons isolé 12 composés flavoniques dont un, le 3 B₂ ou dihydrowogonine, n'avait jamais été trouvé dans le règne végétal. Nous avons établi la nature de 4 d'entre eux : tectochrysine, dihydrotectochrysine, trihydroxy-4, 2', 6' méthoxy-4' chalcone et sakuranétine, et nous avons contribué à l'étude de la structure de la dihydrowogonine.
- 6.2. Nous donnons une technique simple d'isolement de la dihydrorobinétine, du tétrahydroxy-7, 3', 4', 5' flavanediol-3, 4 et de la robtine, à partir de la poudre de bois de Robinia pseudoacacia.
- 6.3. Nous avons également mis au point une microméthode de purification des flavonoïdes de Prunus Mahaleb et de leurs dérivés, afin de pouvoir étudier, au chapitre IV, l'évolution de l'activité spécifique de ces flavonoïdes en fonction du temps.

CHAPITRE III.

UTILISATION DES COMBINAISONS BISULFITIQUES D'ALDEHYDES AROMATIQUES DANS LES SYNTHÈSES RADIOCHIMIQUES

1. INTRODUCTION.

1.1. Règles concernant la synthèse des molécules marquées.

La synthèse des molécules renfermant un atome radioactif (ou radionuclide), appelées aussi molécules marquées, doit tenir compte d'un certain nombre de facteurs :

a) la stabilité de l'atome marqué :

Il faut s'attacher à suivre réellement la structure carbonée et éviter un groupe labile qui serait facilement détaché ou échangé, comme cela serait le cas pour un alcool marqué au tritium sur la fonction hydroxyle, un groupement carboxylique marqué au carbone 14 , facilement décarboxylable.

b) la facilité de détection de la radioactivité :

Plus l'isotope émet des rayonnements mous, plus la mesure devient délicate. C'est le cas du ^{14}C , du ^{35}S et surtout du tritium (^3H ou T) pour lequel des méthodes spéciales de détection sont nécessaires.

c) la période de l'isotope.

Une trop brève durée de vie ne permet pas de synthétiser la molécule marquée et d'effectuer son étude métabolique, avant que son activité ait disparu ou diminué de manière trop sensible. C'est le cas du ^{11}C (période 20,4 mn) ; cet isotope du carbone serait au point de vue détection plus avantageux que le ^{14}C ; le ^{11}C est un émetteur β de 0,99 MeV.

d) l'influence des effets des radiations :

Certaines molécules peuvent se décomposer sous l'action de leur propre rayonnement. C'est par exemple, le cas de la choline marquée au ^{14}C .

Il ne faut pas perdre de vue "l'effet isotopique" qui sera d'autant plus sensible que la différence de masse entre l'isotope utilisé et l'isotope naturel sera plus grande (cas du tritium, variation de masse de 3 à 1).

e) la difficulté d'introduction du radionuclide dans la molécule :

Les techniques de synthèse de la plupart des molécules envisagées sont en général décrites dans la littérature. Pour synthétiser des molécules marquées, le choix de la technique sera fait en fonction :

- des matières premières marquées (dans notre cas, $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$)

- des rendements : le rendement de chaque étape de synthèse doit, dans la mesure du possible, être de 70 à 100 %.

- de l'emploi d'un excès de molécules inertes ; c'est ainsi que, pour la synthèse de l'acide benzoïque ^{14}C - 7, un excès de bromure de phényl-magnésium par rapport au $^{14}\text{CO}_2$ sera utilisé.

- de la facilité de purification des produits obtenus : une distillation fractionnée, par exemple, sera très difficile à réaliser étant donné les faibles quantités de produit manipulé (au maximum, 5 millimoles).

Il sera donc nécessaire, avant de réaliser une synthèse de molécules marquées, d'adapter les techniques décrites dans la littérature à ces exigences.

1.2. Choix du ^{14}C en chimie organique et en chimie biologique.

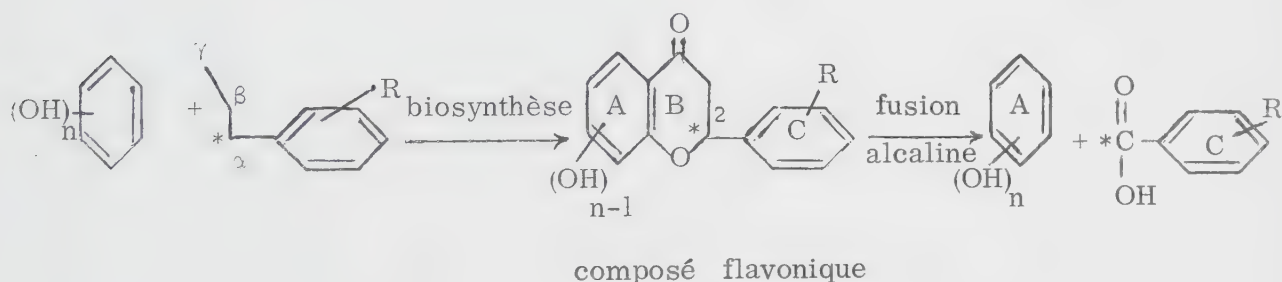
Malgré le faible rayonnement émis par le ^{14}C (émetteur β^- de 0,155 MeV), son emploi en chimie organique et en chimie biologique est très courant. Bien qu'étant un émetteur "mou", cet isotope a une période très longue, 5.600 ans, et, de ce fait, il présente un double avantage :

- le manipulateur est pratiquement à l'abri des effets d'irradiation : les parois des récipients qui le contiennent absorbent ses rayonnements lorsque l'effet de "Bremsstrahlung" est négligeable.

- sa période très longue permet d'envisager des expériences dont la durée peut être de plusieurs années, sans qu'il soit nécessaire de tenir compte du facteur de décroissance de la radioactivité.

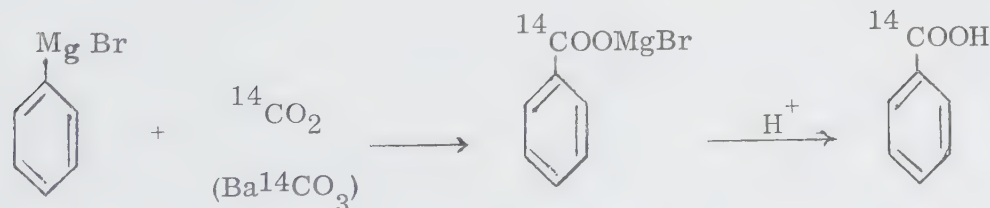
1.3. Choix de la position de l'atome marqué dans les acides cinnamique et phényl-pyruvique.

Dans notre étude biogénétique des dérivés flavoniques à partir d'unités C_6-C_3 ; il sera souhaitable que l'atome radioactif soit en α du noyau aromatique : en effet, si la biosynthèse s'effectue suivant le schéma ci-dessous, le ^{14}C devra être localisé en 2 dans le composé flavonique ; il sera alors très facile, par dégradation du squelette flavonique, d'isoler l'acide benzoïque correspondant au cycle C et carbone 2, ainsi que le polyphénol correspondant au cycle A (80).



2. METHODES DE PREPARATION DES ACIDES CINNAMIQUE, PHENYL-PYRUVIQUE

Comme l'acide benzoïque $^{14}C - 7$ (15) s'obtient facilement par réaction de GRIGNARD, en faisant réagir le $^{14}CO_2$ sur le bromure de phényl-magnésium :



nous avons recherché, dans la littérature, les techniques de synthèse des acides cinnamique et phényl-pyruvique décrites à partir d'acides benzoïques. Nous n'avons trouvé aucune technique à partir de ces acides, mais seulement à partir de composés plus hydrogénés, tels que benzaldéhyde ou chlorure de benzyle. Or, le benzaldéhyde peut s'obtenir facilement par réduction de l'acide benzoïque (16), alors que la préparation du chlorure de benzyle s'effectue avec des rendements plus faibles (18). Nous avons donc étudié des méthodes de préparation des acides cinnamique et phényl-pyruvique, utilisant le benzaldéhyde comme matière première.

2.1. Benzaldéhyde.

Parmi les différentes techniques de réduction permettant d'obtenir les aldéhydes benzoïques à partir d'acides benzoïques ou benzonitriles correspondants, quatre modes opératoires différents sont décrits dans la littérature.

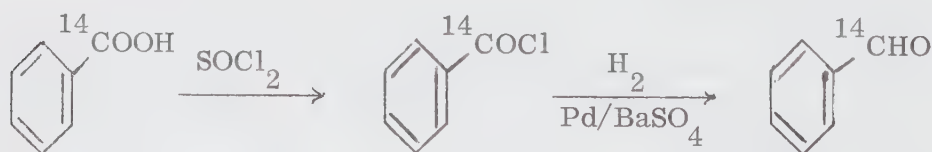


R = H ou X O

X = groupement protecteur

2.1.1. Réduction de ROSENMUND (6, 16, 131, 143).

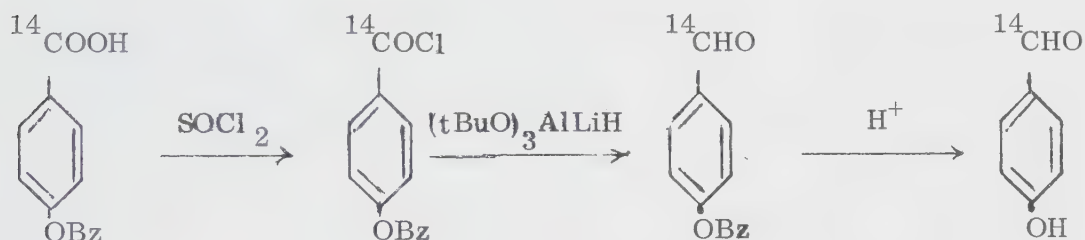
Par action du chlorure de thionyle, l'acide aromatique est transformé en chlorure d'acide qui est réduit par un courant d'hydrogène, en présence de palladium. Les rendements, calculés à partir de l'acide, sont de l'ordre de 70 à 80 %.



Cette technique a été très souvent utilisée (16), pour préparer les aldéhydes aromatiques ^{14}C - 7.

2.1.2. Réduction d'acides aromatiques par le tritertiobutyloxy alumino hydrure de lithium.

KRATZL et BILLECK (74), puis GRISEBACH (52) utilisent le tritertiobutyloxy alumino hydrure de lithium pour préparer le parahydroxy-benzaldéhyde ^{14}C - 7. Les rendements obtenus pour cette synthèse ne dépassent pas 29 % (calculés à partir de l'acide.)

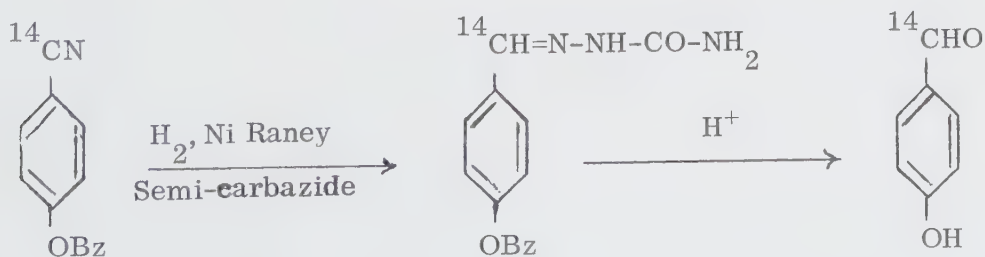


Bz = benzyle

2.1.3. Réduction des nitriles aromatiques (Réaction de STEPHEN, modifiée par PLIENINGER (108)).

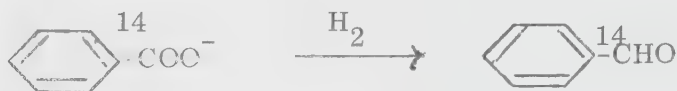
La semi-carbazone de l'aldéhyde est obtenue par réduction des nitriles aromatiques correspondants par de l'hydrogène, en présence de nickel Raney et de semi-carbazide. L'aldéhyde est ensuite libéré par hydrolyse acide.

GRISEBACH et PATSCHKE (55) montrent que cette technique donne jusqu'à 52 % de rendement (calculé à partir du K^{14}CN), pour préparer l'aldéhyde para-hydroxy-benzoïque ^{14}C - 7.



2.1.4. Réduction électro-chimique.

TUPITSYN et SEMENOVA (129) réduisent l'acide benzoïque $^{14}\text{C} - 7$ en benzaldéhyde $^{14}\text{C} - 7$, par voie électrochimique (Rendement : 47-50 %).



Dans tous les cas, la purification de l'aldéhyde obtenu est difficilement réalisable dans les conditions des synthèses radio-chimiques. C'est pourquoi nous avons eu recours à la combinaison bisulfite des aldéhydes aromatiques, pour isoler le composé et le stabiliser. Nous verrons ultérieurement que cette combinaison peut être utilisée directement en synthèse.

2.2. Acide trans-cinnamique.

Dans la littérature, cinq types de synthèse, partant du benzaldéhyde, permettent d'obtenir l'acide trans-cinnamique.

2.2.1. La réaction de PERKIN (106) .

Elle consiste à condenser le benzaldéhyde avec l'anhydride acétique, en présence de catalyseurs (acétate de sodium, acétate de potassium).



Comme le montre le tableau 9, les rendements varient notablement suivant le type de catalyseur utilisé.

Tableau n° 9

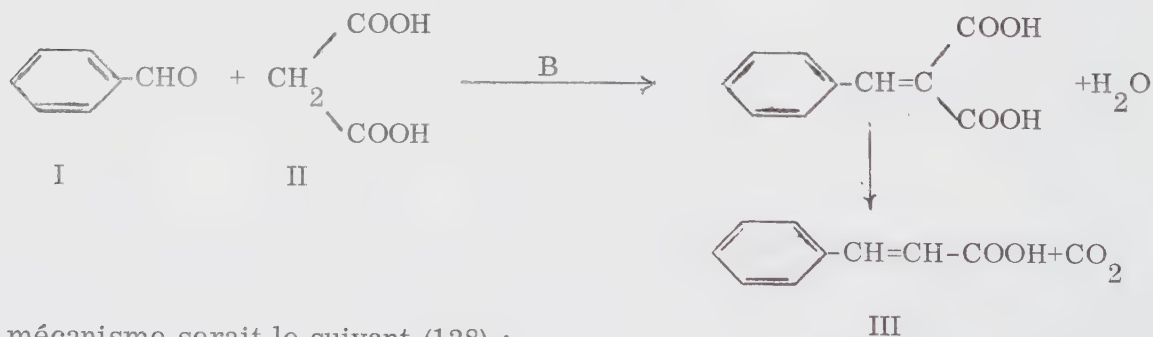
catalyseur	II	rendement en % de III par rapport à I	référence
$\text{CH}_3\text{-COONa}$	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	39	(69)
$\text{CH}_3\text{-COONa}$	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	47	(115)
$\text{CH}_3\text{-COONa}$	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	54	(27)
$\text{CH}_3\text{-COOK}$	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	72,5	(69)
$\text{CH}_3\text{-COONa} + \text{pyridine}$	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	83	(2)
$\text{CH}_3\text{-COONa} + \text{CH}_3\text{-COOK}$	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	86,5	(67)
$\text{CH}_3\text{-COOLi}$	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	9	(115)
K_2CO_3	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	59	(69)
K_2CO_3	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	21	(27)
Na_2CO_3	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	40	(69)
Na_2CO_3	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	32	(27)
Na_3PO_4	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	36	(69)
K_3PO_4	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	20	(69)
K_2SO_3	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	32	(69)
KCN	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	0	(69)
$(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	29	(69)
$(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N} \text{--} \text{CH}_2\text{--C}_6\text{H}_5$	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	6,9	(69)
benzyl-pipéridine	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	8,8	(69)
pyridine	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	1,1	(69)

Tableau n° 9 suite

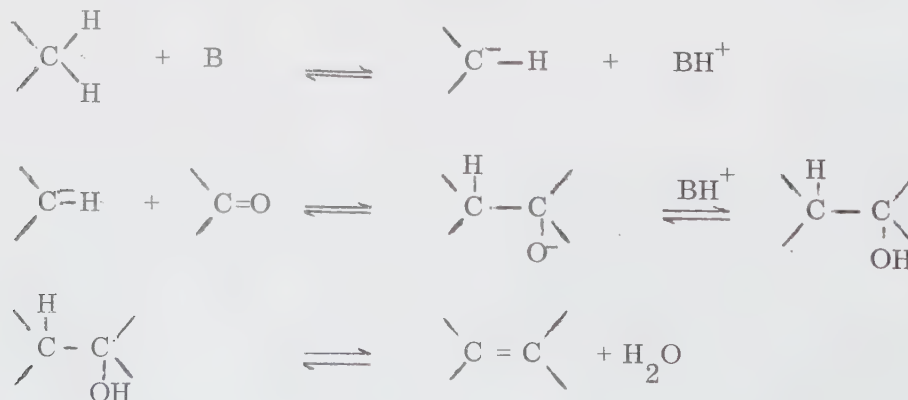
quinoléine	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	trace	(69)
HCOONa	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	48	(27)
CaH_2	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	8, 3	(147)
acétate de plomb	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	5	(86)
$\text{CH}_3\text{-COOK}$	$(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{Si}$	74, 5	(144)
$\text{CH}_3\text{-COONa}$	$(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{Si}$	64	(144)
K_2CO_3	$(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{Si}$	63	(144)

2.2.2. La réaction de DOEBNER (29).

Cette réaction est une modification à la réaction de KNOEVENAGEL (128) ; elle consiste à condenser le benzaldéhyde avec l'acide malonique, en présence d'une base B.



Le mécanisme serait le suivant (128) :



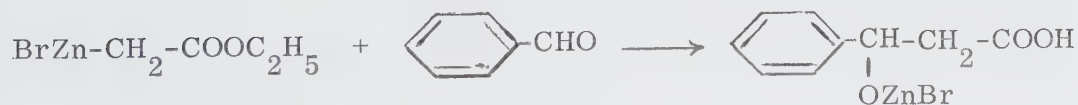
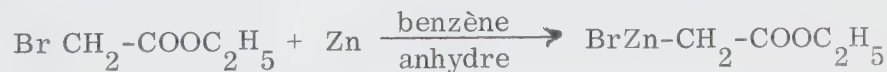
Ici encore, les rendements varient notablement suivant la base B utilisée (voir tableau 10).

Tableau n° 10

B	Rendement de III par rapport à I	Références
aucune	-	(31)
NH ₃ ou toluidine, pipéridine	-	(72)
pyridine + un peu pipéridine	94	(32)
pyridine	94	(102)
quinoléine	81	(34)
CH ₃ -NH-CH ₃	24	(34)
aniline	47	(34)

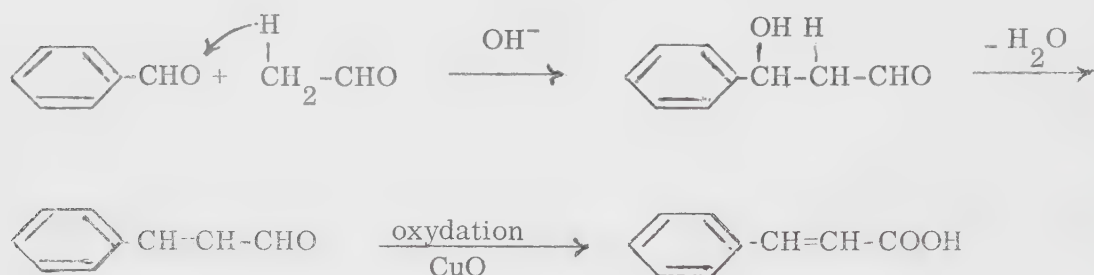
2.2.3. La réaction de Réformatski.

DIPPY et PARKINS utilisent la réaction de REFORMATSKI (28) qui consiste à condenser l'aldéhyde benzoïque avec le bromacétate d'éthyle, en présence de poudre de zinc dans le benzène anhydre. Le rendement de l'acide cinnamique obtenu n'est pas mentionné.

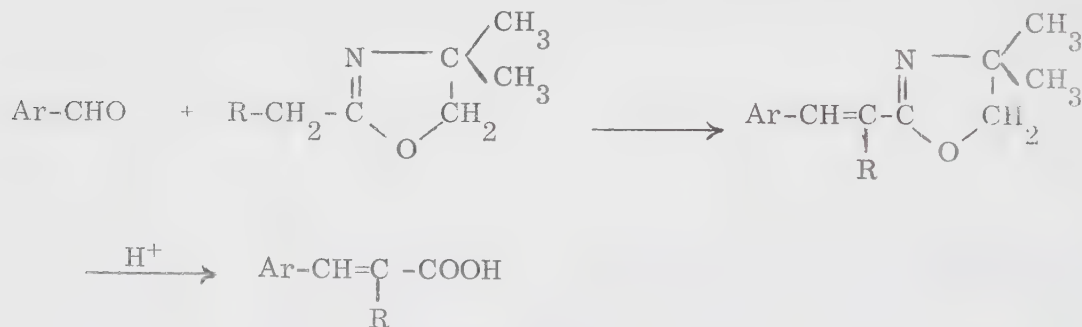


2.2.4. La réaction de crotonisation.

SCIPIONI (120) condense le benzaldéhyde avec l'acétaldéhyde, en milieu alcalin, et obtient, par réaction de crotonisation, le cinnamaldéhyde qu'il oxyde en acide correspondant. Rendement à partir du benzaldéhyde : 43 %.



2.2.5. Une nouvelle synthèse des acides trans-cinnamiques a été décrite par WEHRMEISTER (138). Elle consiste à condenser les aldéhydes aromatiques avec des alkyl-2 oxazolines-3. Cette technique donne des rendements de l'ordre de 75%, comparables à ceux obtenus avec les réactions de PERKIN et de DOEBNER.



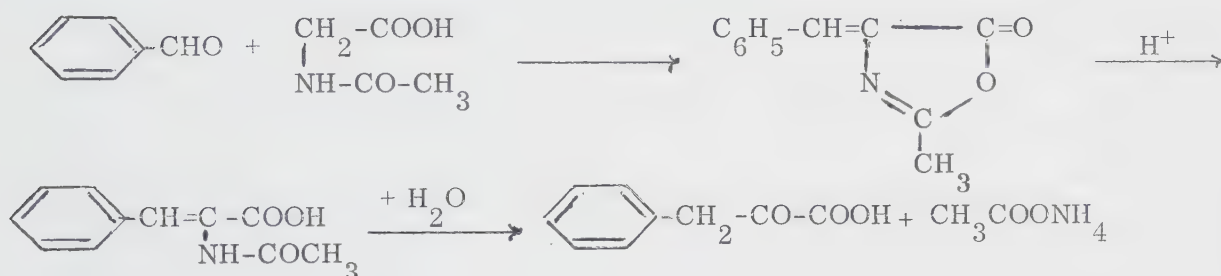
Dans le cas de l'acide trans-cinnamique : $\text{Ar} = \text{C}_6\text{H}_5$
 $\text{R} = \text{H}$

2.3. Acide phényl-pyruvique.

Les principales techniques de synthèse de l'acide phényl-pyruvique, à partir du benzaldéhyde, sont les suivantes :

2.3.1. Synthèse d'ERLENMEYER-PLÖCHL (127).

L'aldéhyde benzoïque est condensé avec un dérivé N acylé (en général benzoyl ou acétyl) du glycolle, en présence d'anhydride acétique et d'acétate de sodium fondu, pour donner une azlactone qui, par hydrolyse acide, fournit l'acide α -cétonique correspondant. Cette technique, proposée par HERBST et SHEMIN dans Synthèses Organiques (63), donne des rendements de 45 à 50 % en acide phényl-pyruvique.



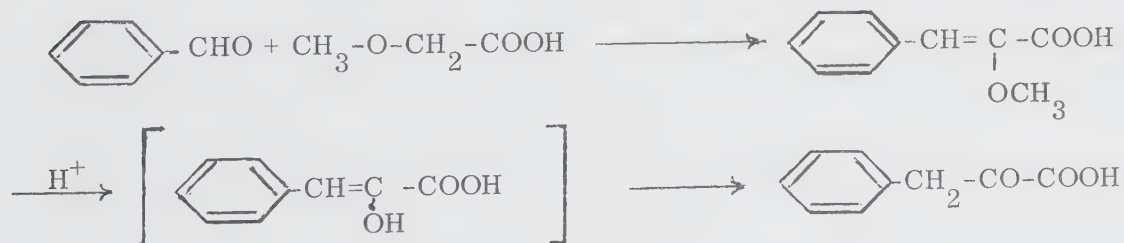
2.3.2. De nombreuses techniques s'inspirant de la synthèse d'ERLENMEYER sont décrites dans la littérature.

- GORIZDRA et BARANOV (40) préconisent le passage par la benzylidène-5 thio-2 oxazolone-3, 4.

- WEYGAND, STEGLICH et TANNER (139) passent par la benzylidène-5 trifluoro-méthyl-2 oxazolone-3, 4.

2.3.3. Condensation de CLAISEN-SCHMID.

GRÖGER et WALDMANN (57), en utilisant la condensation de CLAISEN-SCHMID (126), préparent l'acide phényl-pyruvique, avec un rendement de 38-45 %; en faisant réagir l'acide méthyl-glycolique sur le benzaldéhyde.



3. SYNTHESES RADIOACTIVES MISES AU POINT A PARTIR DE COMBINAISONS BISULFITIQUES D'ALDEHYDES AROMATIQUES.

Au moment où nous avons décrit la synthèse de l'acide trans-cinnamique $^{14}\text{C} - 3$ en utilisant la combinaison bisulfite du benzaldéhyde $^{14}\text{C} - 7$ comme matière première (131), WRIGHT, BROWN et NEISH (14, 143) ont réalisé la synthèse de cet acide en utilisant, eux aussi, la technique de DOEBNER, mais en employant l'aldéhyde benzoïque à l'état libre.

CARTER, FLYNN et NYSTROM (26), de leur côté, ont synthétisé l'acide trans-cinnamique $^{14}\text{C} - 3$ grâce à la réaction de PERKIN.

Puis, KRATZL et BILLECK (74) et GRISEBACH (49) ont synthétisé différents acides trans-cinnamiques $^{14}\text{C} - 3$, en utilisant la technique de DOEBNER.

Tous ces auteurs, en partant de l'aldéhyde aromatique à l'état libre, sont obligés de le purifier en faisant soit la dinitro-2,4 phényl-hydrazone (16), soit la méta-dinitro-phényl-hydrazone (74), puis de le libérer avant de l'utiliser dans le milieu réactionnel, ce qui abaisse notablement le rendement chimique de l'opération.

De même, pour réaliser la synthèse des acides phényl-pyruviques $^{14}\text{C} - 3$, la technique d'ERLENMEYER est utilisée, mais, ici encore, dans le cas de la synthèse de l'acide phényl-pyruvique $^{14}\text{C} - 3$ (14), comme dans celui de l'acide parahydroxy-phényl-pyruvique $^{14}\text{C} - 3$, (6) les auteurs utilisent les aldéhydes aromatiques à l'état libre.

Au point de vue radiochimique, certains aldéhydes, comme le benzaldéhyde, l'anisaldéhyde, sont d'un maniement délicat :

- leur état liquide rend la purification de faibles quantités mal aisée,
- les aldéhydes sont d'une stabilité relative et, en conséquence, leur stockage est difficile.

Pour remédier à ces inconvénients, il nous a paru intéressant d'utiliser directement dans les milieux réactionnels les combinaisons bisulfitiques des aldéhydes aromatiques, qui présentent le triple avantage de permettre :

- leur isolement et leur purification au sein du milieu réactionnel, sans distillation préalable,
- leur stockage, car ces combinaisons sont très stables,

- la manipulation aisée de ces aldéhydes, surtout en opérant sur de faibles quantités, puisqu'ils sont solides.

Dans le cas de la préparation du benzaldéhyde ^{14}C - 7, nous avons vérifié que les rendements obtenus, en isolant cet aldéhyde sous forme de combinaison bisulfite, étaient identiques et même supérieurs à ceux signalés dans la littérature. Puis, nous avons mis au point différentes préparations (acides cinnamiques, phényl-pyruviques, chalcones), en utilisant directement dans le milieu réactionnel les combinaisons bisulfitiques des aldéhydes aromatiques et nous avons vérifié que les rendements étaient compétitifs avec ceux obtenus avec les mêmes quantités d'aldéhydes à l'état libre. Enfin, nous avons réalisé, comme application, de cette technique, les synthèses des acides cinnamique ^{14}C - 3 et phényl-pyruvique ^{14}C - 3.

Nous avons retenu, parmi ces synthèses, celles qui donnaient le rendement maximum :

- pour le benzaldéhyde ^{14}C - 7, la réaction de ROSENMUND :

l'acide benzoïque ^{14}C - 7 ayant déjà été préparé au laboratoire par action du $^{14}\text{CO}_2$ sur le bromure de phényl-magnésium.

- pour l'acide cinnamique, la synthèse de DOEBNER.

- pour l'acide phényl-pyruvique, la synthèse d'ERLENMEYER.

3.1. Préparation de combinaisons bisulfitiques du benzaldéhyde et de l'anisaldéhyde par réduction de ROSENMUND des acides aromatiques correspondants.

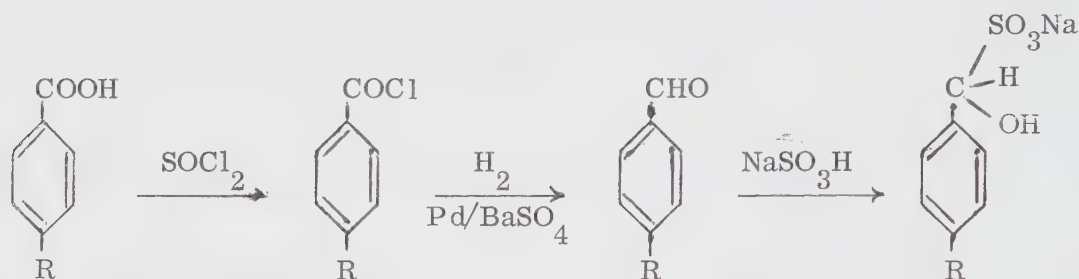
L'acide benzoïque (I) est transformé en chlorure de benzoyle par ébullition de (I) avec du chlorure de thionyle fraîchement distillé. Après 3 heures d'ébullition, l'excès de chlorure de thionyle est chassé sous vide.

Le liquide résiduel est constitué essentiellement par du chlorure de benzoyle qui est réduit, selon la technique de ROSENMUND en faisant barboter un courant d'hydrogène sec en présence de palladium sur BaSO_4 dans du xylène anhydre.

Le déroulement de la réaction est suivi en dosant l'acide chlorhydrique dégagé au fur et à mesure de son apparition. Après quatre à cinq heures de réaction, une solution à 30 % de NaSO_3H est ajoutée. La combinaison bisulfite de l'aldéhyde formé apparaît sous forme 3 de cristaux blancs qui sont essorés et lavés à l'éther sec. Les rendements obtenus figurent sur le tableau 11.

Une technique identique est utilisée avec l'acide anisique, pour obtenir l'anisaldéhyde. Les rendements sont consignés sur le même tableau.

Réactions :



R = H

R = OCH₃

Tableau n° 11

acide de départ	quantité en mM	quantité de combinaison bisulfitique obtenue en mM	Rendement	
acide benzoïque	5, 16	4, 34	84 %	(78-80 %) *
	5	3, 5	70 %	
	4, 14	3, 15	76 %	
	5, 15	4. 15	80 %	
acide anisique	5	4	80 %	(73 %)
	4	3, 20	78 %	
(*) Les nombres entre parenthèses indiquent les rendements obtenus en isolant les aldéhydes sous forme de dinitro-2, 4 phényl-hydrazone.				

Nous voyons que les rendements obtenus en isolant l'aldéhyde sous forme de combinaison bisulfite sont identiques à ceux obtenus lorsque cet aldéhyde est isolé sous forme de dinitro-2, 4 phényl-hydrazone. Le rendement se trouve même amélioré dans le cas de l'aldéhyde anisique.

3.2. Utilisation des combinaisons bisulfiteques d'aldéhydes aromatiques pour la synthèse des acides trans-cinnamiques.

La condensation selon DOEBNER de l'aldéhyde benzoïque avec l'acide malonique en présence de pyridine et de pipéridine est effectuée en utilisant la combinaison bisulfiteque de l'aldéhyde benzoïque, au lieu du corps libre. Les résultats obtenus figurent sur le tableau n° 12.

Tableau n° 12

combinaison bisulfiteque du benzaldéhyde en mM	acide malonique en mM	pyridine	pipéri- dine	température de chauffage ° C	temps en heures	rendement en %
		en ml	en gouttes			
1	1,5	7	3	137	2	54
1	1,5	7	3	135	3	50
1	1,5	7	3	135	4	75
1	1,5	7	3	135	1,5	67
1	2	7	3	125 - 130	1,5	67,5
1	2	7	3	125 - 130	5	75
1	1,5	7	3	135	3,5	75

Ce tableau montre qu'il est nécessaire, pour obtenir les meilleurs rendements, d'opérer avec un temps de chauffage assez long. Le résultat optimum est atteint après 3 H. 30 de chauffage.

Une condensation, effectuée avec des quantités identiques de benzaldéhyde pris cette fois à l'état libre et fraîchement distillé, nous a donné un rendement optimum de 76 %, semblable à celui trouvé à partir de la combinaison bisulfiteque (75 %).

D'autres acides trans-cinnamiques ont été préparés à partir des combinaisons bisulfiteques d'aldéhydes aromatiques d'une part et à partir de ces mêmes aldéhydes libres d'autre part.

Les conditions opératoires sont identiques à celles qui correspondent au rendement optimum trouvé précédemment avec la combinaison bisulfite du benzaldéhyde.

Nous avons obtenu les résultats suivants, Tableau 13.

Tableau n° 13

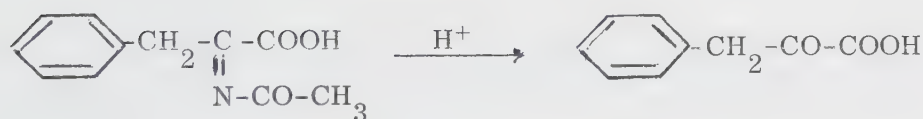
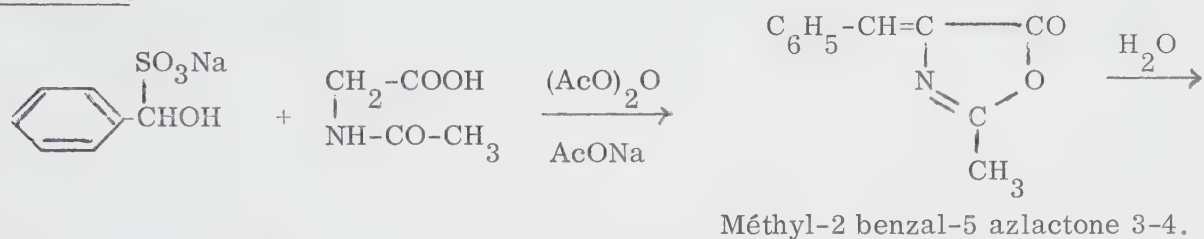
nature de l'aldéhyde	combinaison bisulfitique en mM	aldéhyde libre en mM	Rendement en acide trans-cinnamique correspondant
benzaldéhyde*	5	1	76 %
	1		75 %
			76 %
anisaldéhyde	5	5	50 %
			40 %
pipéronal	5	5	65 %
			63 %
(*) Dans nos conditions, en opérant sur 5, 16 mM, le rendement est de 63 %, calculé à partir de l'acide benzoïque. Le rendement obtenu par WRIGHT, BROWN et NEISH est de 60 % à partir de l'acide benzoïque ¹⁴ C - 7, en opérant sur 8, 4 mM. (143).			

Avec les combinaisons bisulfite, les rendements sont légèrement supérieurs à ceux trouvés avec l'aldéhyde pris à l'état libre. Il faudrait poursuivre l'étude systématique avec les combinaisons bisulfite de l'anisaldéhyde et du pipéronal pour trouver les rendements optima.

3.3. Utilisation des combinaisons bisulfiteques d'aldéhydes aromatiques pour la synthèse d'acides phényl-pyruviques.

La synthèse s'effectue normalement selon la technique utilisant la réaction d'ERLENMEYER, mais le benzaldéhyde est remplacé par la combinaison bisulfiteque.

Réaction.



La partie la plus délicate est la synthèse de la benzal-5 méthyl-2 azlactone-3, 4. L'étude des conditions opératoires est résumée dans le tableau 14.

Tableau n° 14

combinaison bisulfiteque du benzaldéhyde en mM	N-acétyl- glycine en mM	anhydride acétique en mM	acétate de Na en mg	temps de reflux	rendement en %
5	5, 1	30	200	30 mn	54
5	5, 1	30	200	1 h.	64
5	5, 1	30	200	3 h.	72
5	5, 1	30	200	4 h.	71
5	5, 1	30	200	5 h.	70

Ici encore, nous avons essayé de généraliser l'utilisation des combinaisons bisulfiteuses en effectuant la synthèse de l'acide para-méthoxy-phényl-pyruvique à partir de la combinaison bisulfiteuse de l'anisaldéhyde et nous avons comparé les rendements obtenus avec les opérations faites sur les mêmes quantités d'aldéhyde libre, fraîchement distillé. Les résultats figurent sur le tableau 15.

Tableau n° 15

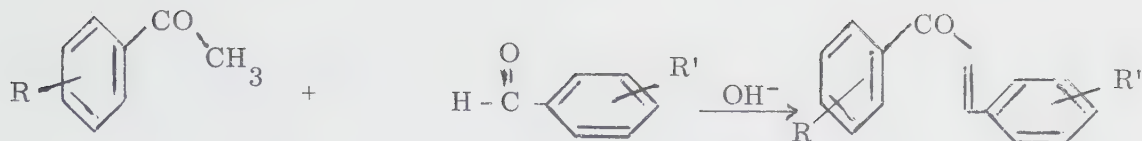
nature de l'aldéhyde	combinaison bisulfiteuse en mM	aldéhyde libre en mM	rendement en acide phényl-pyruvique correspondant
benzaldéhyde	5	5	45 %
	5		50 %
			48 %
anisaldéhyde	5	5	30 %
	5		40 %
			38 %

Les rendements en acide phényl-pyruvique ou en acide para-méthoxy-phényl-pyruvique sont du même ordre de grandeur lorsqu'on utilise la combinaison bisulfiteuse ou l'aldéhyde libre fraîchement distillé.

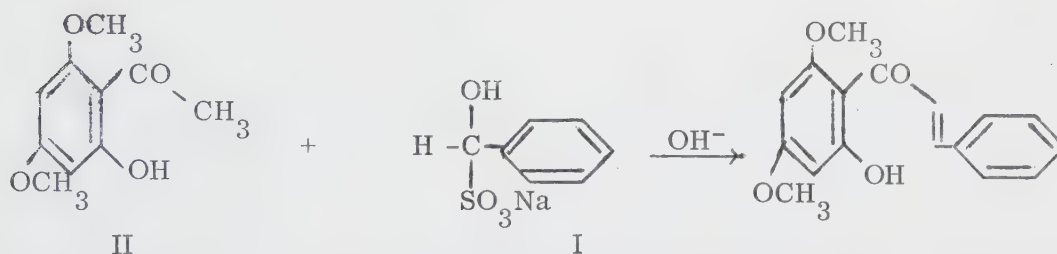
Signalons que la benzal-5 méthyl-2 azlactone-3, 4 peut conduire, par hydrolyse alcaline, à la phényl-alanine (59), ce qui permet d'utiliser les combinaisons bisulfiteuses d'aldéhyde pour obtenir les acides aminés aromatiques correspondants.

3.4. Utilisation de la combinaison bisulfiteuse du benzaldéhyde pour la synthèse de chalcone.

Enfin, nous avons montré que les combinaisons bisulfiteuses d'aldéhydes aromatiques pouvaient être utilisées dans la synthèse de chalcone. Cette synthèse consiste à condenser, en milieu alcalin, une acétophénone, en présence d'aldéhyde aromatique.



Nous avons réalisé, en utilisant directement la combinaison bisulfite-que du benzaldéhyde, la synthèse de l'hydroxy-2' diméthoxy-4', 6' chalcone, en condensant cette combinaison bisulfitique sur la diméthyl-4, 6 phloracétophénone.



Dans un erlen de 25 ml, (1) et (II) sont mélangés, puis ajoutés à a ml de NaOH à 30 % et b ml d'alcool. Après un temps t, la solution est acidifiée par HCl, à pH 1. Le précipité est essoré et recristallisé dans un mélange alcool-eau. F. 89° C.

Les résultats de cette condensation sont consignés dans le tableau 16.

Tableau n° 16

combinaison bisulfitique I en mM	diméthyl- phloracétophénone II en mM	a: NaOH 30 % en ml	b: C ₂ H ₅ OH en ml	t : temps de séjour en milieu alcalin	rendement chalcone brute
2	2, 3	5	15	15 h.	26 %
1	1	2, 5	7, 5	15 h.	64 %
1	1	2, 5	7, 5	40 h.	88 %
1	1	3	5	40 h.	85 %
1, 17	1, 17	3, 5	5, 5	40 h.	72 %

Cette technique donne d'excellents rendements, 88 %, pour préparer la chalcone.

3.5. Conclusion.

Les combinaisons bisulfitiques d'aldéhydes aromatiques sont utilisables directement dans la synthèse des acides cinnamiques, phényl-pyruviques et même des chalcones, au même titre que les aldéhydes aromatiques pris à l'état libre. Les rendements sont comparables et même parfois supérieurs à ceux obtenus avec les aldéhydes pris à l'état libre.

Cette méthode paraît très utile en radiochimie, puisqu'elle permet l'emploi d'un dérivé stable des aldéhydes, et peut certainement être généralisée à d'autres synthèses.

4. PARTIE EXPERIMENTALE.

4.1. Combinaison bisulfitique du benzaldéhyde ^{14}C - 7 (ROSENMUND)

4.1.1. Préparation du catalyseur (16)

1,3 g de Na_2SO_4 cristallisé est dissous dans 19 ml d'eau, solution (I) puis 2 g de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sont dissous dans 19 ml d'eau distillée, solution (II).

La solution (II) est portée à 70°C , puis versée dans la solution (I). Le précipité blanc de BaSO_4 est filtré sur verre fritté n° 3, puis lavé à l'eau chaude, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de précipité, avec une solution de AgNO_3 .

Le précipité est remis en suspension dans 30 ml d'eau contenant 1,8 ml de solution de formaldéhyde à 30 %, à l'aide d'un agitateur magnétique. La solution est chauffée à 80°C et additionnée lentement d'une solution contenant 150 mg de PdCl_4 en solution dans 9 ml d'eau et 0,1 ml d'acide chlorydrique concentré. Le mélange, maintenu à 80°C , toujours sous agitation, est alors neutralisé lentement par une solution de soude normale jusqu'à pH 7. Le chauffage et l'agitation sont poursuivis encore 10 minutes, puis le précipité est filtré sur verre fritté n° 3 et lavé à l'eau chaude jusqu'à obtention d'une réaction négative avec une solution de AgNO_3 . Le catalyseur, d'aspect gris clair, est séché sous vide dans un dessiccateur.

4.1.2. Préparation de l'empoisonneur.

Faire refluer, pendant 5 heures, 6 g de quinoléine fraîchement distillée avec 1 g de soufre dans 70 ml de xylène anhydre. La solution devient brun foncé.

4.1.3. Préparation de la solution de FIESER.

Cette solution élimine les dernières traces d'oxygène pouvant exister dans l'hydrogène avant de faire barboter ce gaz dans le milieu réactionnel.

A une solution de potasse (20 g de KOH dans 100 ml d'eau distillée) portée à l'ébullition, sont ajoutés 2 g d'anthraquinone β -sulfonate de sodium et 15 g d'hydrosulfite de sodium. La solution d'un rouge sang est conservée à l'abri de l'air.

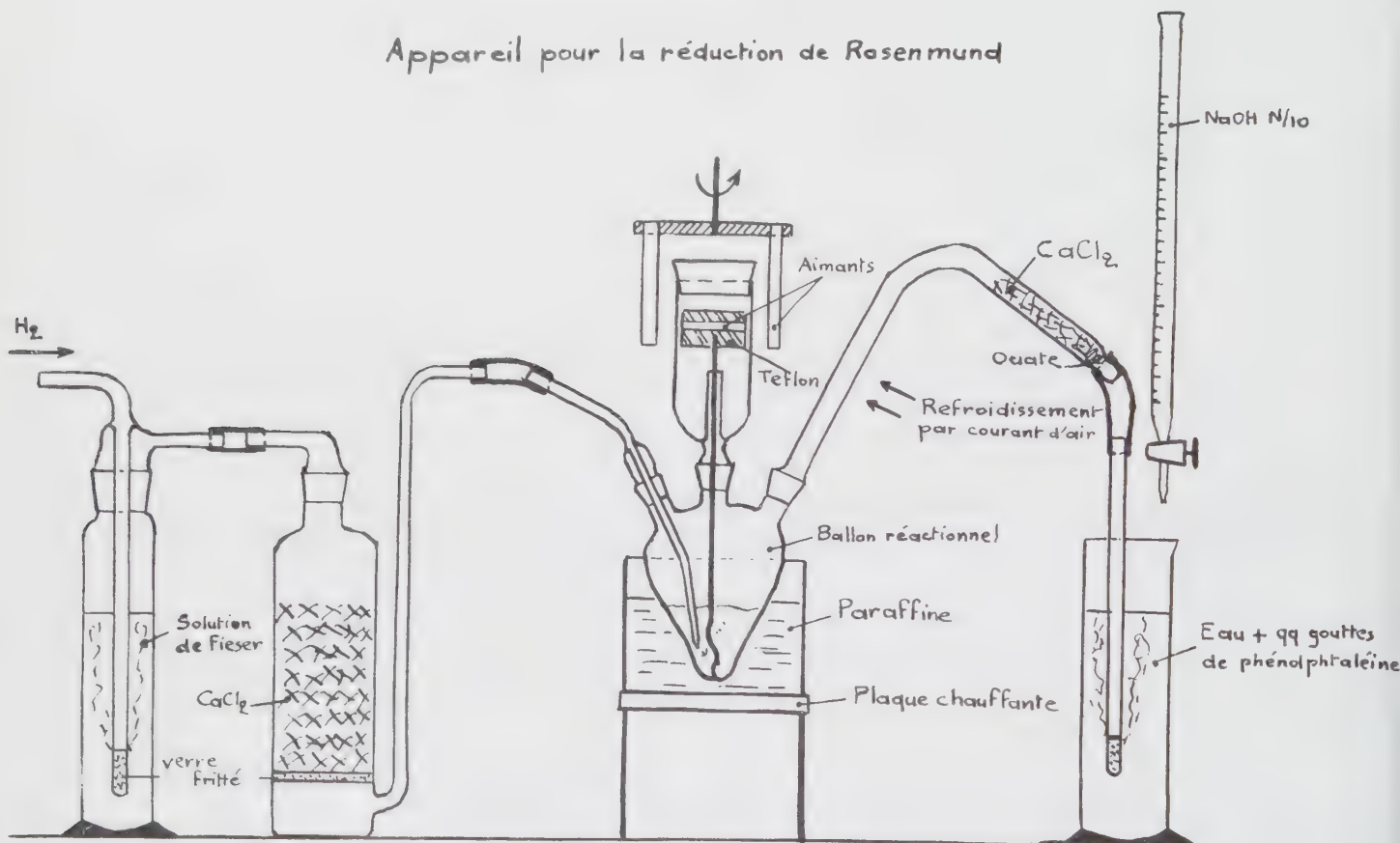
4.1.4. Chlorure de benzoyle ^{14}C - 7.

Dans un ballon à fond conique de 50 ml à 3 tubulures, sont placés 5 mM d'acide benzoïque ^{14}C - 7 As 1,25 mc/mM et 6 ml de chlorure de thionyle fraîchement distillé. Les deux tubulures latérales sont fermées par l'intermédiaire de 2 bouchons rôdés graphités. La tubulure centrale est surmontée d'un tube de verre de $\varnothing$ 10 mm, de longueur 1m, qui servira de réfrigérant. Le mélange est porté au reflux sous une hotte bien ventilée, pendant 6 heures. L'excès de chlorure de thionyle est alors chassé sous vide après refroidissement du ballon réactionnel. Le chlorure de benzoyle ^{14}C - 7 restant au fond du ballon est alors utilisé directement, sans purification, pour la réduction de ROSENMUND.

4.1.5. Combinaison bisulfitique du benzaldéhyde ^{14}C - 7,



Appareil pour la réduction de Rosenmund



Dans un erlen de 10 ml, à 4 ml de xylène séché sur sodium, sont ajoutés 2 μ l de l'empoisonneur, puis 50 mg de catalyseur finement broyé après addition. Transvaser le mélange dans le ballon de 50 ml à 3 tubulures contenant le chlorure de benzoyle ^{14}C - 7 et rincer le petit erlen avec 2 fois 2 ml de xylène. L'appareil est monté conformément au schéma ci-dessus puis purgé par un courant d'hydrogène sec pendant 20 minutes sous agitation. Le ballon réactionnel est chauffé de manière à porter le xylène au reflux.

La cinétique de la réaction est suivie en neutralisant par une solution de soude N/10 l'acide chlorhydrique dégagé.

temps en mn	0	12	21	27	172	197	225	265
ml de NaOH N/10 t = 1, 03	0	2	4	6	25	27	29	31

Après 4 h. 30, le chauffage est arrêté. La solution, après refroidissement, est filtrée dans un bécher de 50 ml contenant 7 ml d'une solution de NaSO_3H à 30 %. Après 1 h. 30 d'agitation, le précipité blanc cristallin est filtré, lavé trois fois avec 5 ml d'éther sec, puis séché sous vide. Nous avons obtenu 735 mg de combinaison bisulfite du benzaldéhyde, soit un rendement de 70 % à partir de l'acide benzoïque ^{14}C - 7.

4.2. Acide trans-cinnamique ^{14}C - 3, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-}^{14}\text{CH=CH-COOH}$.

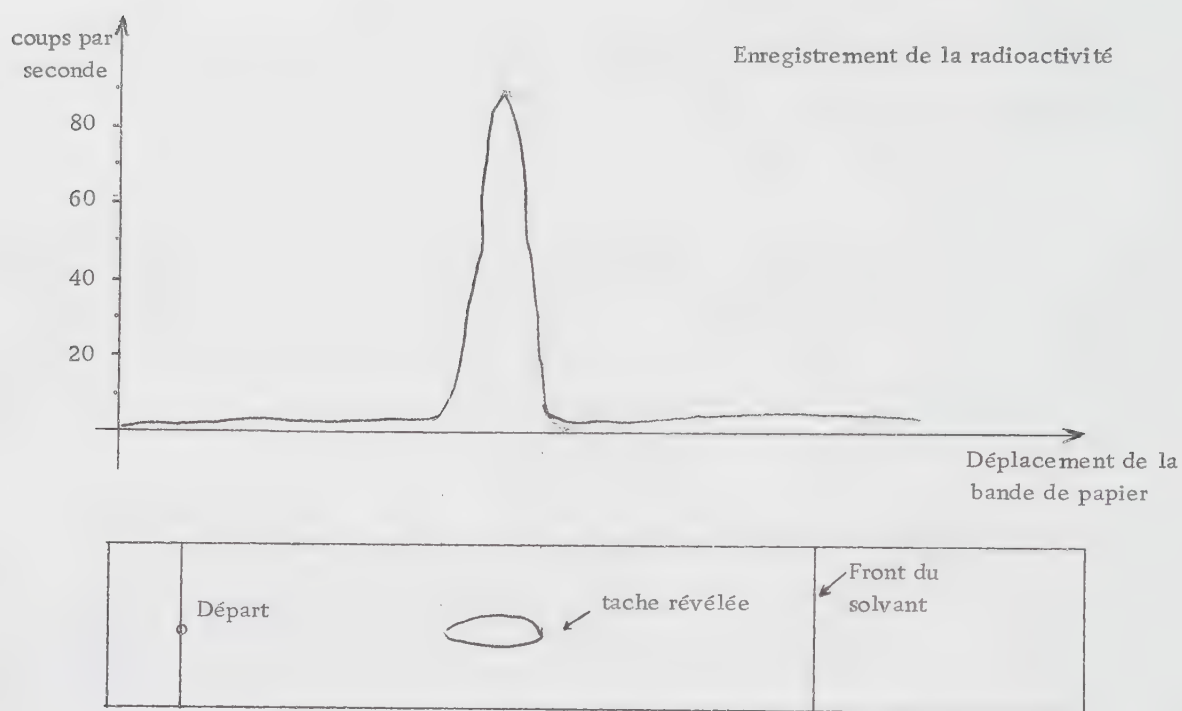
50 mg de la combinaison bisulfite du benzaldéhyde obtenue dans l'opération précédente, 200 mg de combinaison bisulfite du benzaldéhyde inerte, soit en tout 1, 18 mM, et 185 mg (1, 74 mM) d'acide malonique sont introduits dans un ballon à fond conique de 15 ml, ainsi que 7 ml de pyridine sèche et 3 gouttes de pipéridine. Un tube de 10 mm de diamètre et de 1 m de longueur est adapté au ballon et le mélange est chauffé pendant 3 h. 30, à 125-130° C, puis concentré sous vide jusqu'à 1 ml environ. 10 ml d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl concentré : 5 ml - eau : 5 ml) sont ajoutés. La solution est placée une nuit au réfrigérateur. L'acide cinnamique qui a précipité est filtré puis séché. 137 mg (0, 93 mM) de corps brut sont obtenus, F. 128° C (bloc Maquenne), soit un rendement de 78 %.

L'acide est recristallisé dans un mélange de 8 ml d'eau et 2 ml d'éthanol. 116 mg (0, 78 mM) d'acide trans-cinnamique sont obtenus, F. 132° C (en tube scellé), F. de l'acide trans-cinnamique inerte 132° C (en tube scellé), F. du mélange des deux acides 132° C (en tube scellé).

Le rendement chimique en produit recristallisé s'élève à 66, 7 %.

L'acide trans-cinnamique radioactif a été chromatographié sur papier whatman n° 1 avec un acide trans-cinnamique inerte, comme témoin. Le solvant utilisé est : acide acétique 2 - eau 98 . L'acide radioactif a été révélé à l'aide d'un appareil automatique, mis au point avec la collaboration de P. VERCIER.

L'enregistrement n'a montré qu'un seul pic qui se superpose exactement avec la tache de l'acide trans cinnamique révélé sur le chromatogramme à l'aide d'une solution diluée de permanganate de potassium, Rf 0, 50.



La détermination de l'activité spécifique a été effectuée par la méthode dite de placage direct, à l'aide d'un compteur geiger à fenêtre TGC_2 .

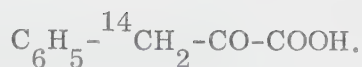
1ère analyse : $240 \pm 2 \mu\text{c}/\text{mM}$.

2ème analyse : $242 \pm 2 \mu\text{c}/\text{mM}$.

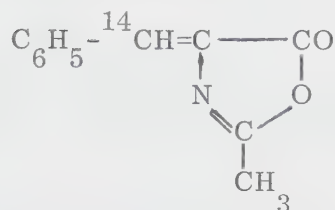
soit en activité spécifique : $241 \mu\text{c}/\text{mM}$.

Le rendement radiochimique à partir de l'acide benzoïque $^{14}\text{C} - 7$ et compte-tenu de la dilution faite avec la combinaison bisulfite du benzaldéhyde est de 96 %.

4. 3. Acide phényl-pyruvique $^{14}\text{C} - 3$,

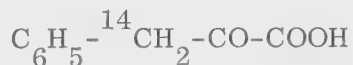


4. 3. 1. Benzal- $^{14}\text{C} - 5$ méthyl-2 azlactone-3, 4



Dans un ballon à fond conique de 50 ml, sont placés 210 mg (1 mM) de combinaison bisulfite du benzaldéhyde (activité spécifique 1, 25 mc/mM), 840 mg (4 mM) de combinaison bisulfite du benzaldéhyde inerte, 600 mg (5, 1 mM) de N-acétyl-glycine, 200 mg d'acétate de sodium fondu finement pulvérisé et 3 ml ($\approx$ 30 mM) d'anhydride acétique. Le ballon est surmonté d'un tube de 10 mm de diamètre et de 1 m de longueur. Le mélange, sous agitation manuelle, est plongé 10 à 15 minutes dans un bain-marie bouillant jusqu'à obtention d'une solution limpide. Il est alors porté au reflux pendant 3 heures. La solution brun foncé est abandonnée au réfrigérateur durant la nuit. Le solide brun obtenu est désagrégé à l'aide d'un agitateur dans 30 ml d'eau glacée, le ballon lui-même étant refroidi dans un mélange eau-glace. Après 45 minutes, le solide jaune obtenu est essoré et séché. Nous avons obtenu 672 mg (3, 6 mM), soit un rendement de 72 %, F. 148° C, F. Benzal-5 méthyl-2 azlactone-3, 4 de référence 148° C, F. du mélange des deux substances 148° C.

4. 3. 2. Acide phényl-pyruvique $^{14}\text{C} - 3$,



Dans un ballon à fond rond de 100 ml, sont placés les 672 mg de benzal-5 méthyl-2 azlactone-3, 4 précédemment obtenus, 6, 5 ml d'acétone et 2, 25 ml d'eau. Un tube de verre de 10 mm de diamètre et de 1 m de longueur est adapté sur le ballon. La solution est portée au reflux pendant 3 heures. L'acétone est chassé sous vide puis on ajoute 10, 3 ml d'une solution d'acide chlorhydrique (eau 9 ml - HCl conc. 1, 3 ml). La nouvelle solution est portée au reflux 3 heures. Après refroidissement, la solution obtenue, de couleur saumon, est extraite dans un extracteur liquide, pendant une nuit, à l'éther. La solution étherée est concentrée sous vide. Le résidu jaune est recristallisé dans 8 ml d'eau bouillante. Par refroidissement, des aiguilles blanches apparaissent, après un séjour d'une nuit au réfrigérateur. Le précipité est essoré et lavé avec 2 fois 2 ml d'eau glacée. Les aiguilles sont séchées.

Poids obtenu : 294 mg (1, 8 mM), soit un rendement de 50 %.

F. 154° C (en tube scellé), F. acide phényl-pyruvique de référence 154° (en tube scellé), F. des 2 substances mélangées 154° (en tube scellé).

Le rendement chimique en produit cristallisé, à partir de la combinaison bisulfite de l'aldéhyde, est de 36 %.

L'acide phényl-pyruvique radioactif a été chromatographié sur papier Whatman n° 4 avec un acide phényl-pyruvique inerte comme témoin. Le solvant utilisé est : n-butanol saturé d'eau.

L'acide radioactif a été révélé à l'aide de l'appareil automatique cité plus haut. L'enregistrement n'a montré qu'un seul pic radioactif qui se superpose exactement avec la tache de l'acide phényl-pyruvique révélé sur le chromatogramme à l'aide de la lumière ultraviolette à 254 m μ et d'une solution de dinitro-2,4 phényl-hydrazine (tache orangée), R_f 0,88.

La détermination de l'activité spécifique de l'acide phényl-pyruvique ^{14}C - 3 a été effectuée, comme celle de l'acide trans-cinnamique, par la méthode dite de placage direct.

1ère analyse : 231 $\mu\text{c}/\text{mM}$ $\pm$ 2

2ème analyse : 234 $\mu\text{c}/\text{mM}$ $\pm$ 2,

soit une activité spécifique moyenne de 232,5 $\mu\text{c}/\text{mM}$.

Le rendement radiochimique à partir de la combinaison bisulfite est de 93 %.

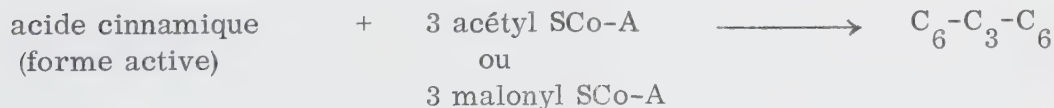
C H A P I T R E IV

=====

INCORPORATION DES ACIDES TRANS-CINNAMIQUE ¹⁴C - 3 ET PHENYL-PYRUVIQUE ¹⁴C - 3 DANS LES FLAVANONES ET FLAVANONOLS .

1. INTRODUCTION.

Comme nous l'avons signalé au premier chapitre, un certain nombre d'unités C₆-C₃ ont été incorporées dans la catéchine (23, 25) les flavonols (130), les anthocyanes (42), les leucoanthocyanes (76), les flavones (112) et les isoflavones (45). Parmi ces unités, l'acide cinnamique paraît se condenser avec 3 unités d'acétyl SCo-A (malonyl SCo-A) pour donner naissance à une unité C₆-C₃-C₆, du type chalcone.



Dans ces conditions, l'acide cinnamique pourrait s'incorporer dans les flavanones et les flavanonols, en suivant une voie identique.



Cependant, aucune preuve expérimentale n'a été apportée pour vérifier cette hypothèse in vivo.

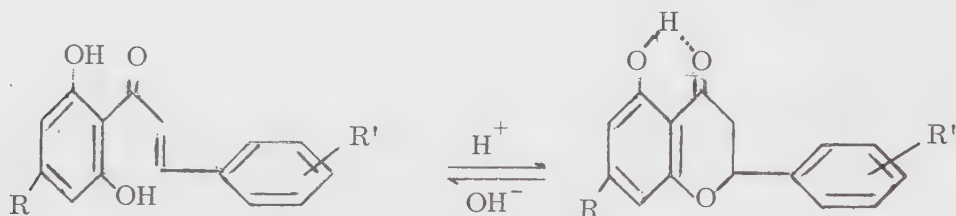
Cette réaction de cyclisation des chalcones doit être catalysée par des enzymes puisqu'un grand nombre de flavanones naturelles sont optiquement actives.

Bien que SHIMOKORIYAMA (124) ait mis en évidence, dans l'écorce de citron, un système enzymatique catalysant la réaction :



aucun de ces enzymes n'a pu être isolé à l'état pur.

Il nous faut signaler que cette transformation de chalcone en flavanone est assez facile à réaliser in vitro. En effet, il existe un équilibre en solution aqueuse entre la chalcone et la flavanone ; celui-ci peut être déplacé vers la flavanone, dans le cas particulier des chalcones hydroxylées en 2' et 6' par suite de l'existence d'un pont hydrogène stabilisant la structure de la flavanone.



Cet équilibre peut aussi être modifié par des variations de pH ; en milieu acide, la structure cyclique est plus stable, alors qu'en milieu alcalin c'est la forme ouverte qui prédomine.

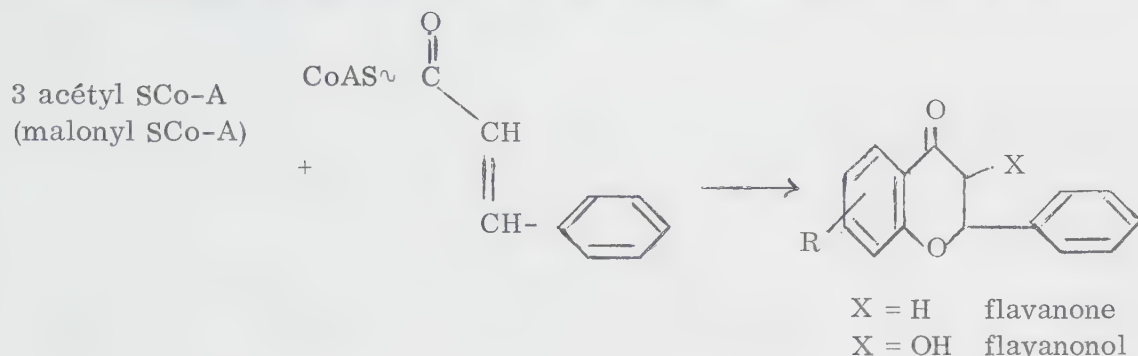
Il paraît donc à priori très difficile de mettre en évidence cet intermédiaire "type chalcone" dans la formation des flavanones et des flavanonols. C'est pourquoi nous avons plus précisément recherché s'il existait une corrélation entre l'incorporation de l'acide cinnamique et de l'acide phényl-pyruvique dans les flavanones et dans les flavanonols.

2. INCORPORATION DE L'ACIDE CINNAMIQUE DANS LES FLAVANONES ET LES FLAVANONOLS.

L'acide trans-cinnamique ¹⁴C - 3 a été administré aux différentes espèces précédemment étudiées :

- Robinia pseudoacacia,
- Prunus avium,
- Prunus Mahaleb.

Les flavanones et les flavanonols contenus dans le bois de ces arbres ont été isolés et leur radioactivité mesurée. Par dégradation, l'atome radioactif a pu être localisé en position 2, comme le laissait supposer le schéma de l'incorporation de l'acide cinnamique dans les dérivés flavoniques, suivant MENTZER :



Les résultats suivants ont été obtenus dans les espèces étudiées.

2.1. Robinia pseudoacacia (132).

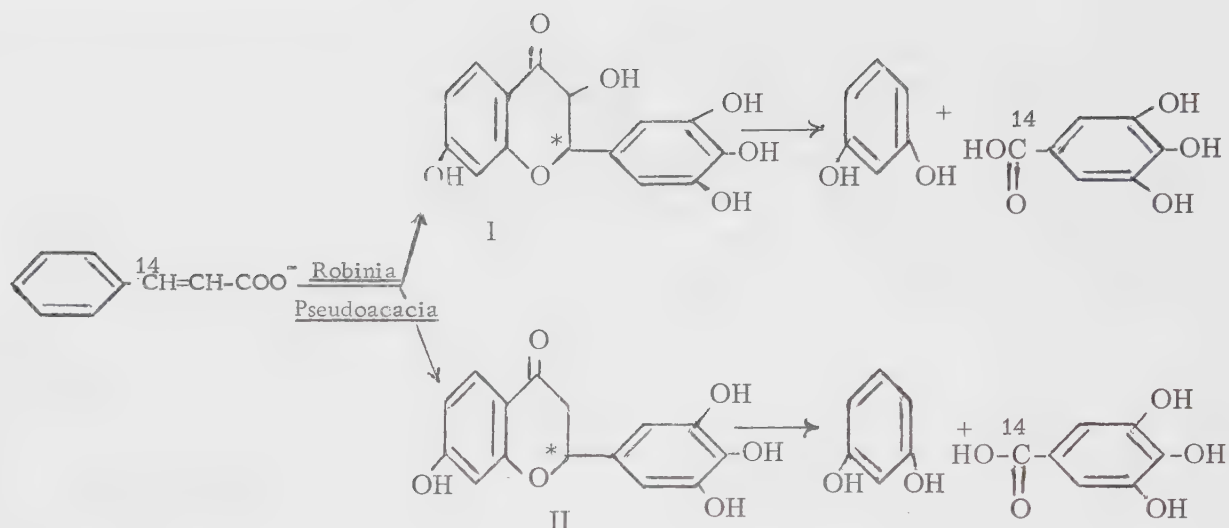
A partir de branches de Robinia pseudoacacia, nous avons isolé la dihydrorobinétine (I) ou tétrahydroxy-7, 3', 4', 5' flavanonol, $\delta = 280$,

et la robtine (II) ou tétrahydroxy-7, 3', 4', 5' flavanone, $\delta = 4000$ radioactives

La dégradation, par fusion alcaline, de ces deux flavonoïdes donne de la résorcine inerte et de l'acide gallique radioactif, de même activité spécifique moléculaire (AsM) que celle trouvée pour la dihydrorobinétine et la robtine initiales.

δ représente la dilution de l'activité du composé par rapport au composé radioactif administré.

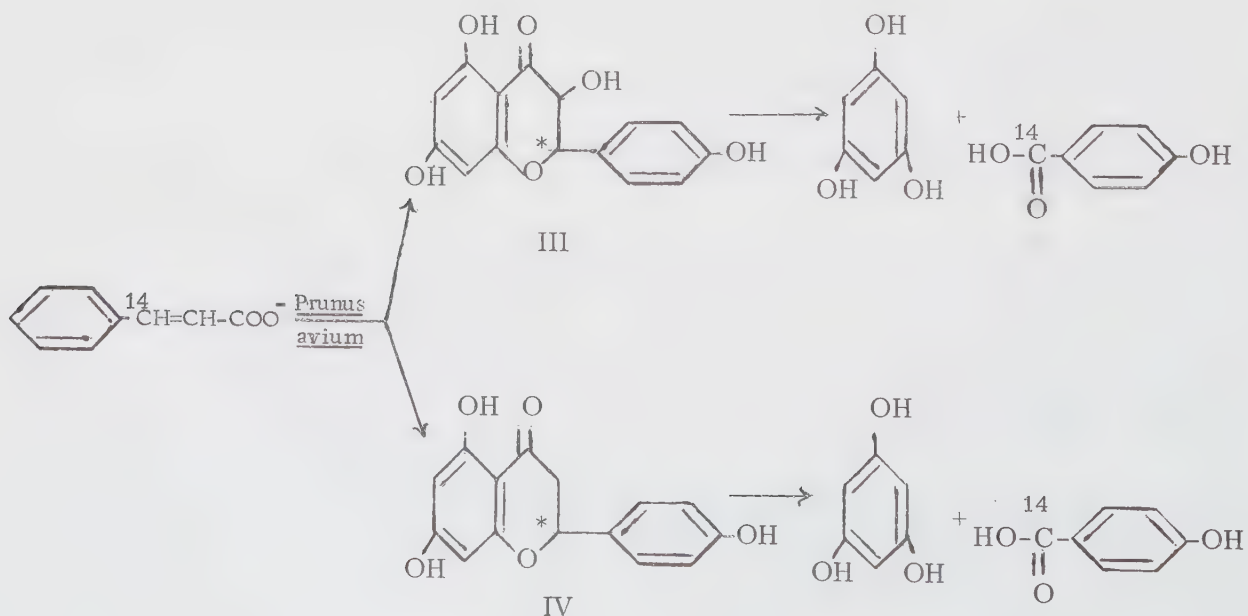
$\delta =$ activité spécifique moléculaire du composé administré/activité spécifique moléculaire du composé isolé.



2.2. Prunus avium (133).

Une deuxième expérience, faite avec Prunus avium, nous a permis d'isoler, à partir des branches, l'aromadendrine (III) ou trihydroxy-5, 7, 4' flavanonol, $\delta = 17.000$, et la naringénine (IV) ou trihydroxy-5, 7, 4' flavanone,

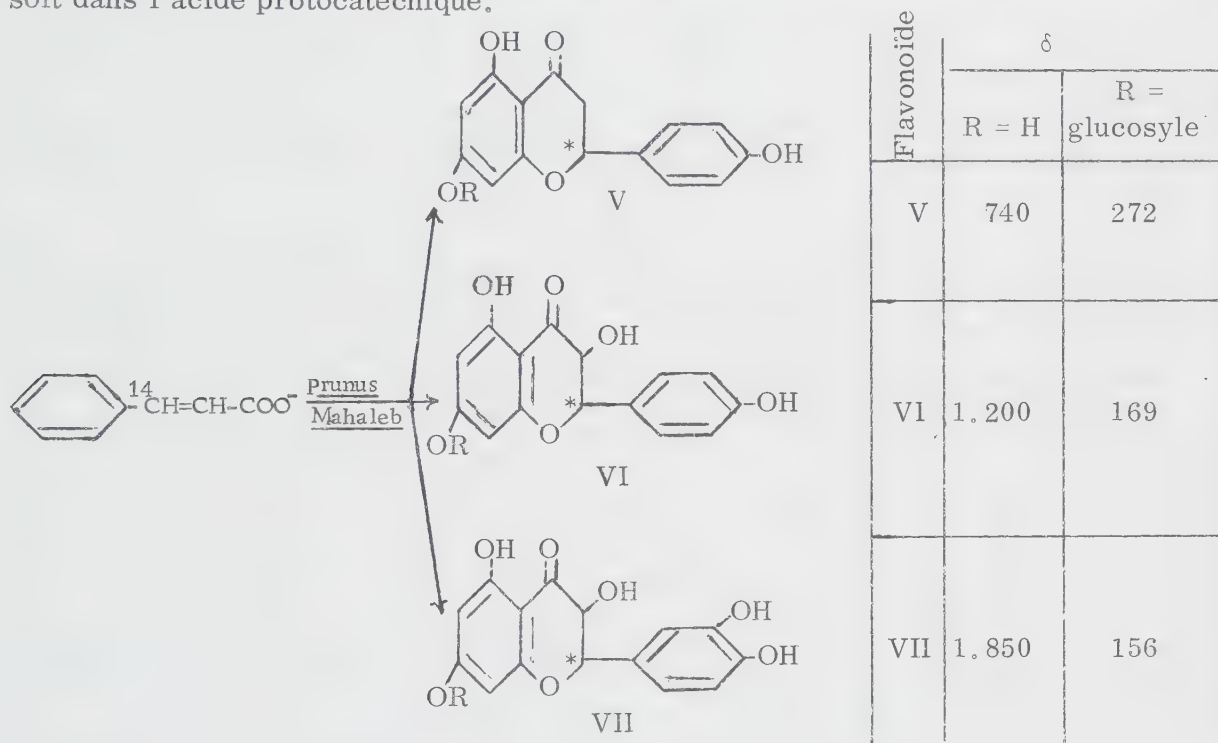
$\delta = 3.800$, radioactives qui, par fusion alcaline, donnent la phloroglucine inerte et l'acide para-hydroxy-benzoïque radioactif qui porte toute la radioactivité contenue dans le flavanonol et la flavanone isolés.



2.3. Prunus Mahaleb (135).

Enfin, une troisième expérience, faite avec Prunus Mahaleb, a permis d'isoler, la naringénine (V), l'aromadendrine (VI), la taxifoline (VII) ou tétrahydroxy-5, 7, 3', 4' flavanonol et les dérivés glucosylés en 7 correspondant à ces trois flavonoïdes, radioactifs.

Ici encore, comme le montre la dégradation de ces six composés, la radioactivité est entièrement contenue soit dans l'acide para-hydroxy-benzoïque, soit dans l'acide protocatéchique.



2.4. Conclusion.

Il ressort des expériences précédentes que l'acide trans-cinnamique s'incorpore dans les flavanonols et les flavanones, ceux-ci ayant un noyau A :

- soit du type résorcylique (dihydrorobinétine, robtine),
- soit du type phloroglucinique (aromadendrine, taxifoline, naringénine).

La fusion alcaline de ces flavonoïdes permet d'isoler des acides benzoïques qui recèlent toute la radioactivité contenue dans le flavonoïde initial, ce qui laisse supposer que l'atome ^{14}C est en position 2, conformément au schéma biosynthétique donné ci-dessus.

3. INCORPORATION DE L'ACIDE PHENYL-PYRUVIQUE DANS LES FLAVANONES ET LES FLAVANONOLS DE PRUNUS MAHALEB (134).

Après administration d'acide phényl-pyruvique ^{14}C - 3 à un Prunus Mahaleb, la prunine (glucosyl-7 naringénine), la glucosyl-7 aromadendrine, l'aromadendrine, la glucosyl-7 taxifoline et la taxifoline sont radioactives. L'atome radioactif est localisé en position 2, comme l'a montré la fusion alcaline de ces composés.

Une expérience faite simultanément sur le même arbre, mais avec une branche différente, pendant le même temps, 58 jours, avec l'acide trans-cinnamique ^{14}C - 3 a montré, comme l'indique le tableau 17, que l'acide cinnamique ^{14}C - 3 est globalement mieux incorporé que l'acide phényl-pyruvique, dans les flavanones et les flavanonols ou leurs glucosides.

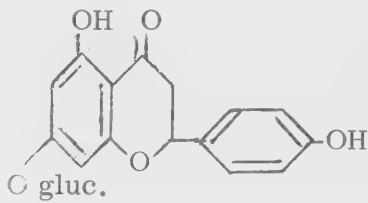
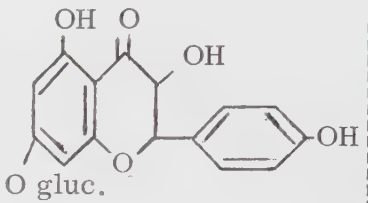
Tableau n° 17

Incorporation comparée des acides cinnamique et phényl-pyruvique $^{14}\text{C} - 3$
dans les composés flavoniques de Prunus Mahaleb. (58 jours)

Composés étudiés	Prunine	naringénine	glucosyl-7 aromadendrine	aromadendrine	glucosyl-7 taxifoline	Taxifoline
	AsM cpm. mM^{-1} (*)	AsM cpm. mM^{-1}	AsM cpm. mM^{-1}	AsM cpm. mM^{-1}	AsM cpm. mM^{-1}	AsM cpm. mM^{-1}
ac. phényl pyruvique. $^{14}\text{C} - 3$ AsM $250 \mu\text{ c mM}^{-1}$	1350	-	73.000	3400	38.000	30.400
						8200
ac. trans- cinnamique $^{14}\text{C} - 3$ AsM $250 \mu\text{ c mM}^{-1}$	270	340.000	1.475.000	208.000	1.600.000	135.000
						1850

(*) c.p.m. mM^{-1} : coups par minute par millimole.

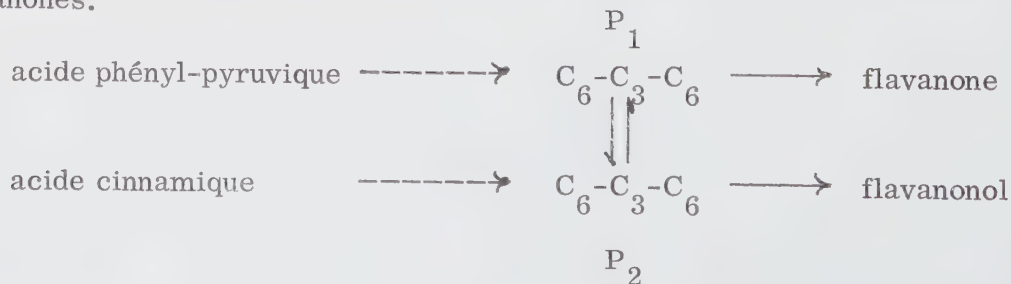
Cependant, il existe une certaine sélectivité d'incorporation de chacune de ces unités $C_6 - C_3$ dans un type de dérivé flavonique déterminé.

composés	 prunine	 glucosyl-7 aromadendrine	Rapport flavanone/ flavanonol
Acide phényl-pyruvique	$\delta = 1300$	$\delta = 34000$	$\approx 0,05$
Acide cinnamique	$\delta = 270$	$\delta = 170$	2,0

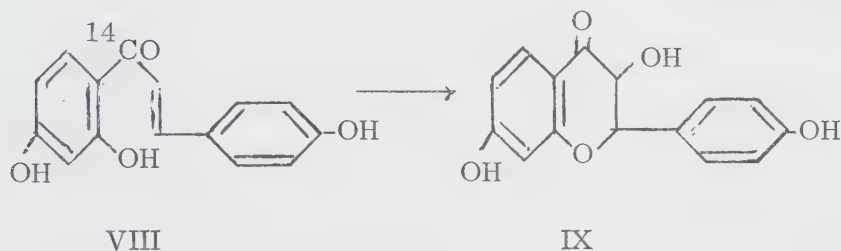
Conclusion.

D'après ces résultats, il semble probable que les acides cinnamique et phényl-pyruvique soient des précurseurs des flavanones et flavanonols.

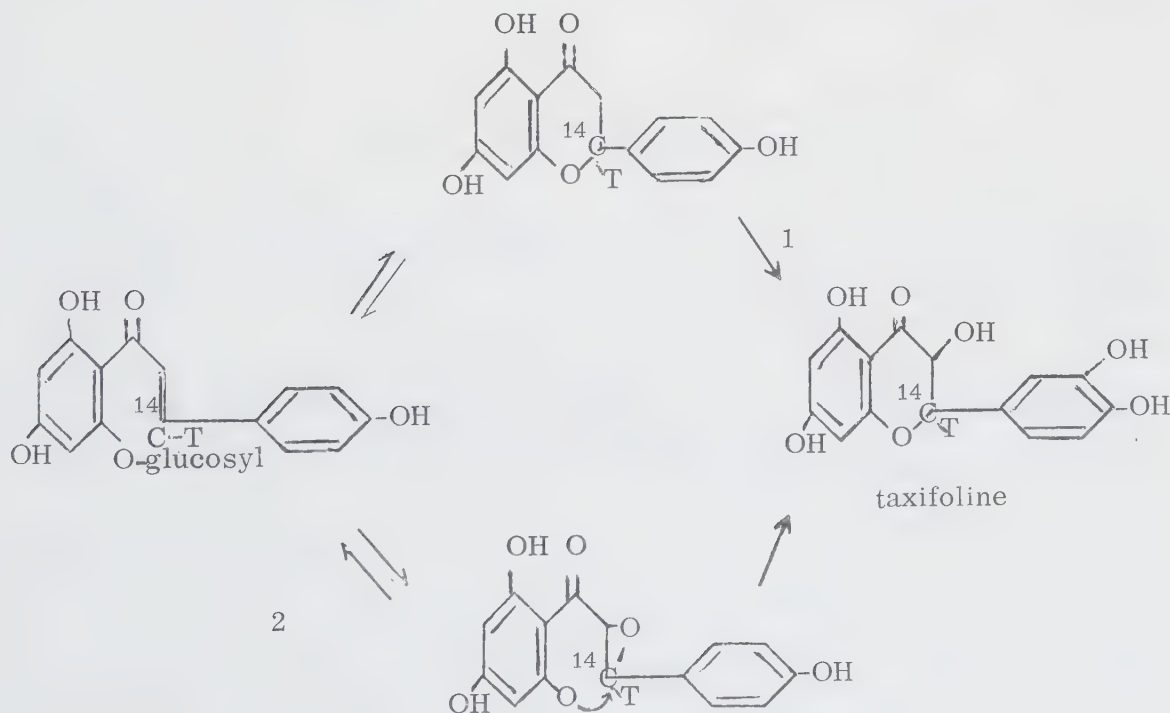
L'incorporation de l'acide phényl-pyruvique dans les flavonoïdes étudiés est moins élevée que celle de l'acide cinnamique. Cependant, si l'on compare les rapports d'incorporation de ces deux acides dans la prunine et la glucosyl-7 aromadendrine (couple flavanone-flavanonol), ces rapports indiquent que la filiation de l'acide phényl-pyruvique est plus directe avec les flavanones qu'avec les flavanonols, alors que l'acide cinnamique est plus directement précurseur des flavanonols que des flavanones.



Récemment, après que nous ayons montré l'incorporation de l'acide cinnamique dans les flavanones et flavanonols. WONG (141) puis WONG et GEISSMAN (142) ont montré que l'isoliquiritigénine carbonyl ^{14}C (VIII), ou trihydroxy-4, 2', 4' chalcone, administrée à des pois chiche (*Cicer arietinum*), se transforme en garbanzol (IX) ou dihydroxy-7, 4' flavanonol, l'incorporation de la radioactivité dans le garbanzol étant approximativement 0,55 % de celle de la chalcone administrée.



GRISEBACH et KELLNER (51), après avoir injecté la glucosyloxy-2' trihydroxy-4, 4', 6' chalcone $\beta^{14}\text{C}$, βT chez *Chamaecyparis obtusa*, ont isolé la taxifoline radioactive. La dégradation de la taxifoline obtenue montre que le ^{14}C et le T sont localisés en position 2. Les résultats permettent d'envisager la transformation des chalcones en flavanone, puis en flavanonol (voie 1) ou la transformation suivant la voie 2, chalcone $\longrightarrow$ époxy-chalcone (?) et flavanonol, ce qui est partiellement en accord avec nos résultats.



4. ETUDE CINETIQUE DE L'INCORPORATION DE L'ACIDE TRANS-CINNAMIQUE ^{14}C - 3 DANS LES COMPOSES FLAVONIQUES DE PRUNUS MAHALEB.

4.1. Introduction.

En vue de vérifier la transformation possible des flavanones en flavanols par hydroxylation en 3, l'acide cinnamique ^{14}C - 3 est injecté à un Prunus Mahaleb. L'évolution de la radioactivité de la prunine, de la naringénine, de la glucosyl-7 aromadendrine, de l'aromadendrine, de la glucosyl-7 taxifoline et de la taxifoline est mesurée en fonction du temps, pour établir une telle filiation si elle existe.

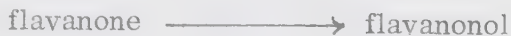
En effet, d'après la théorie exposée dans notre introduction, l'évolution, en fonction du temps, de l'activité spécifique moléculaire (AsM) d'une flavanone (ou de son glucoside) et d'un flavanol (ou de son glucoside), contenus dans la même espèce, permet de savoir si la transformation :



est possible ou non.

Chez Prunus Mahaleb, une expérience de ce type peut être réalisée en comparant l'évolution des AsM de la naringénine (ou de la glucosyl-7 naringénine : prunine) aux AsM de l'aromadendrine (ou de la glucosyl-7 aromadendrine), en fonction du temps.

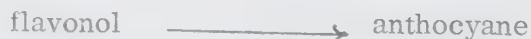
Si la transformation :



est possible, l'AsM de la naringénine (ou de la prunine) doit être d'abord supérieure à l'AsM de l'aromadendrine (ou de la glucosyl-7 aromadendrine), puis, pour un temps plus long, la situation doit s'inverser.

Signalons que GRISEBACH et BOPP (48), en injectant de la phényl- alanine ^{14}C - 1 à du sarrasin, ont pu montrer, en utilisant le même raisonnement, que la rutine (rhamno-glucosyl-3 quercétine) ne pouvait être le précurseur d'un glucoside de cyanidine contenu dans cette plante.

La transformation :



semble être exclue dans cette espèce, et même dans d'autres (23, 76).

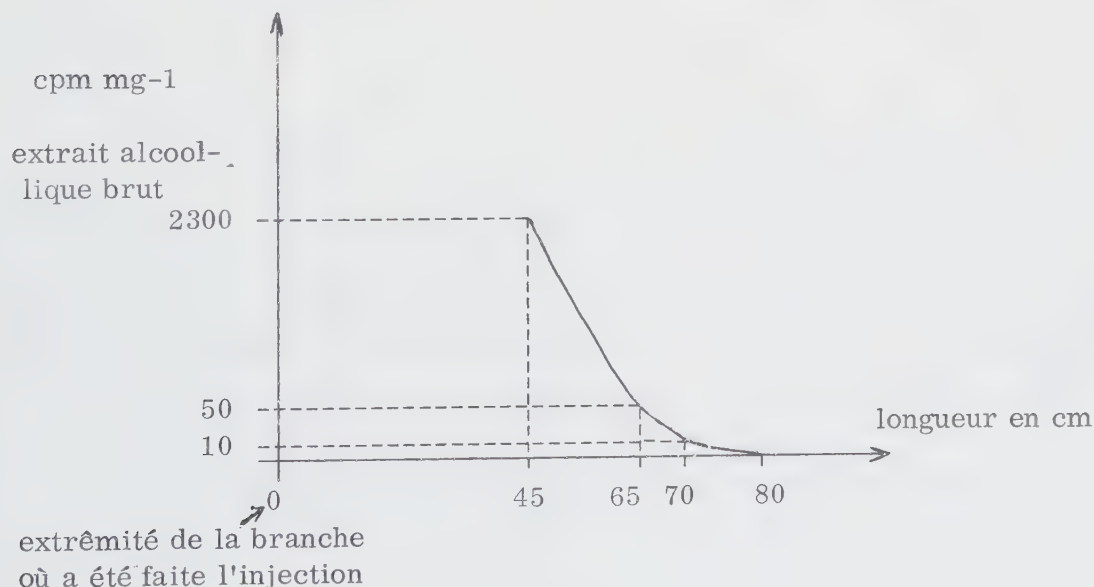
Il est à remarquer que pour faire une étude de ce type, il vaut mieux injecter une molécule assez éloignée de la portion de chaîne métabolique étudiée, en vue de ne pas créer trop de "perturbations" à ce niveau. Les quantités de composés injectés saturant en général la ou les chaînes métaboliques qui les contiennent normalement et qui fonctionnent dans les deux sens : anabolisme et catabolisme.

Pour réaliser l'expérience qui nous intéresse, il semble plus logique d'injecter une unité $C_6 - C_3$ (acide cinnamique) qu'une unité $C_6 - C_3 - C_6$ (chalcone) radioactive.

4.2. Incorporation de l'acide cinnamique dans les flavanones et flavanonols de Prunus Mahaleb, en fonction du temps (135).

Pour éviter les fluctuations statistiques qui sont inévitables lorsque l'on utilise des plants différents de la même espèce, l'acide cinnamique radioactif est injecté aux extrémités de trois branches latérales d'un même arbre. La longueur de ces trois branches A, B, C, doit être suffisante (supérieure à 1,5 m) pour éviter le cheminement des produits radioactifs d'une branche à l'autre.

Une expérience préliminaire montre que la radioactivité décelable 60 jours après l'injection s'étend au maximum sur une longueur de 80 cm, comme le montre le diagramme suivant :



Les branches A, B, C, sont coupées respectivement 2, 17 et 58 jours après l'injection. Le bois de chaque branche, préalablement broyé, est extrait plusieurs fois à l'alcool, à froid puis à chaud. Les extraits alcooliques de chaque branche sont réunis et concentrés sous vide. Les trois extraits obtenus sont fractionnés par chromatographie sur papier. Plusieurs chromatographies successives sont nécessaires pour isoler séparément les 6 composés flavoniques étudiés (prunine, naringénine, glucosyl-7 aromadendrine, aromadendrine, glucosyl-7 taxifoline, taxifoline) (Technique décrite au chapitre II).

La pureté chimique de chacun d'eux est déterminée par chromatographie sur papier, spectrométrie U.V., P.F., réactions colorées. La radioactivité est alors mesurée en vue de déterminer leur AsM.

Les AsM sont ensuite corrigées en multipliant la valeur trouvée par un coefficient qui tient compte des quantités d'acides cinnamiques ^{14}C - 3 injectées et des différents poids d'extrait sec obtenu à partir des 3 branches A, B, C.

Tableau n° 18

Valeur des coefficients de correction.

	Branche		
	A	B	C
Durée de l'expérience en jours	2	17	58
Poids de cinnamate de K administré (AsM 250 $\mu\text{c}/\text{mM}$)	12	15	16,5
Poids de l'extrait sec obtenu, en g	3,12	2,13	3,5
Coefficient	1	0,55	0,82

Exemple de calcul du coefficient correspondant à la branche B :

$$\frac{12 \times 2,13}{15 \times 3,12} = 0,55$$

Les activités spécifiques moléculaires trouvées sont les suivantes,
Tableau 19.

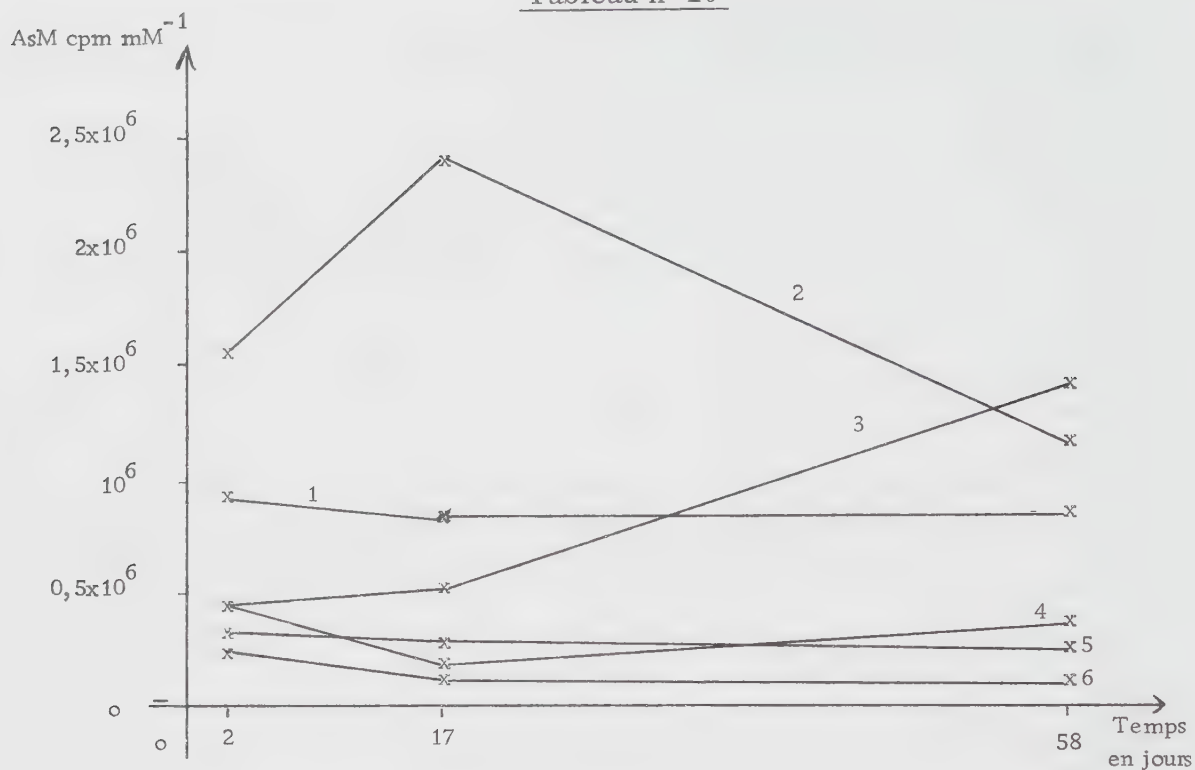
Tableau n° 19

AsM (cpm mM^{-1}) des flavanones et flavanonols
de Prunus Mahaleb, en fonction du temps.

Corps analysé	Branche					
	A		B		C	
	AsM mesurée	AsM corrigée	AsM mesurée	AsM corrigée	AsM mesurée	AsM corrigée
naringénine	345,000	345,000	280,000	154,000	340,000	272,000
aromadendrine	300,000	300,000	310,000	170,000	208,000	166,000
taxifoline	210,000	210,000	191,000	105,000	135,000	108,000
prunine (glucosyl-7 naringénine)	830,000	830,000	1,400,000	770,000	920,000	735,000
glucosyl-7 aromadendrine	1,530,000	1,530,000	4,200,000	2,300,000	1,475,000	1,175,000
glucosyl-7 taxifoline	350,000	350,000	725,000	400,000	1,600,000	1,310,000

Sur le tableau 20, nous avons noté la représentation graphique de l'évolution des AsM, en fonction du temps.

Tableau n° 20



- | | |
|----------------------------|-----------------|
| 1 prunine | 4 naringénine |
| 2 glucosyl-7 aromadendrine | 5 aromadendrine |
| 3 glucosyl-7 taxifoline | 6 taxifoline |

4.3. Conclusion.

Les résultats obtenus permettent de tirer quelques conclusions :

4.3.1. En comparant l'évolution des AsM de la prunine (glucoside de flavanone), et de la glucosyl-7 aromadendrine (glucoside de flavanonol), il semble exclus que la prunine puisse donner naissance à la glucosyl-7 aromadendrine par hydroxylation en 3, l'AsM de la prunine étant toujours inférieure à l'AsM de la glucosyl-7 aromadendrine. Ces deux glucosides pourraient se former à partir d'un précurseur commun, par exemple un glucoside de chalcone. La voie 2, proposée par GRISEBACH permettrait d'interpréter ces résultats.

Il faut cependant remarquer que des époxy-chalcones (ou glucoside d'époxy-chalcone) n'ont jamais été isolés dans la nature, mais la présence simultanée d'eau oxygénée et de chalcones dans le règne végétal est possible.

4.3.2. GRISEBACH (47), dans une mise au point récente, suppose que les glucosides de flavonoïdes se formeraient après la formation de l'aglycone. Les résultats d'un certain nombre d'expériences d'enzymologie sont en accord avec une telle hypothèse.

a) Isolement d'un système enzymatique qui catalyse la glucosylation des flavonols.

- MARSH (78) montre qu'un extrait de haricot (*Phaseolus vulgaris*) catalyse la formation de β D glucuronido-quercétine à partir de l'acide uridine diphosphoglucuronique.

- BARBER (3), à partir de la même plante, isole un système enzymatique qui catalyse la formation de rutine (rhamno-glucosyl-3 quercétine), à partir d'uridine diphospho-L-rhamnose et de β glucosyl-3 quercétine.

b) Enfin, HARBORNE (60), dans une étude récente, montre que la formation des di-, tri-saccharides s'effectuerait par addition graduelle de monosaccharides sur les monosaccharides des flavonoïdes.

Les résultats de notre étude cinétique effectuée chez *Prunus Mahaleb* ne sont pas favorables à l'hypothèse de GRISEBACH. Dans cette expérience, les monoglucosides 7 de flavanones ou flavanonols doivent se former avant les aglycones puisque l'AsM des glucosides est environ dix fois plus forte que celle des aglycones libres et ceci durant tout le cours de nos essais.

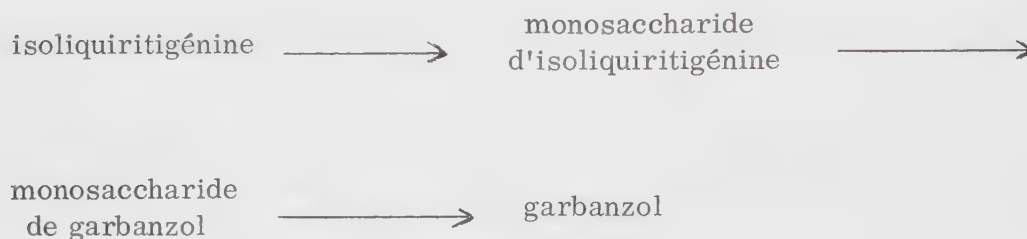
Les expériences de MARSH et BARBER, utilisant un système enzymatique, peuvent très bien être réversibles et, de plus, ces auteurs étudient la glucosylation de l'hydroxyle en 3 et non en 7.

Les conclusions d'HARBORNE ne sont pas en désaccord avec les résultats obtenus puisque le matériau de départ, dans ce cas, est un monosaccharide de flavonoïde.

4.3.3. Il faut remarquer l'incorporation assez élevée (1,7 %) de l'acide cinnamique dans la glucosyl-7 aromadendrine après 17 jours. UNDERHILL et Coll. (130) ont trouvé, dans le sarrazin, une incorporation semblable de l'acide shikimique (2,7 %), de la phénylalanine (1,5 %) et acide cinnamique ^{14}C (0,58 %) dans la

quercétine, tandis que WONG et GEISSMAN (142), à partir d'un glucoside de chalcone, l'isoliquiritigénine, n'obtiennent que 0,55 % d'incorporation de la radioactivité dans le flavanonol : le garbanzol chez le pois chiche.

Le taux d'incorporation relativement faible de l'isoliquiritigénine dans le garbanzol peut s'expliquer si la transformation de chalcone en flavanonol s'effectue sur les monoosides ; il faudrait avoir la séquence :



4.3.4. La diminution d'AsM de la glucosyl-7 aromadendrine semble coïncider avec un accroissement de l'AsM de la glucosyl-7 taxifoline ; l'hydroxylation en 3' de la première pourrait conduire à la seconde.

En une seule expérience, il est évident que le problème de l'hydroxylation du phényle latéral des flavonoïdes ne peut être résolu ; mais ces résultats coïncident avec ceux obtenus chez les flavonols de Prunus avium, à la suite des expériences faites avec COMTE (24).

De plus, il faut rappeler qu'UNDERHILL et Coll. (130) ont montré que l'acide caféique s'incorpore environ huit fois moins que l'acide cinnamique dans la quercétine, chez le sarrasin. L'hydroxylation du phényle latéral pourrait s'effectuer au stade du précurseur glucoside $C_6-C_3-C_6$. Les expériences récentes de HILLIS et ISOÏ apportent aussi des arguments en faveur de cette hypothèse, comme le montre le tableau suivant 21.

Tableau n° 21

"Eucalyptus sidéroxylon" (mutant)	Composés administrés	
	phényl- alanine U- ¹⁴ C	tyrosine U- ¹⁴ C
	AsM:cpm μM^{-1}	AsM:cpm μM^{-1}
engélitine (rhamnosyl-3 aromadendrine)	127	4, 4
nicotiflorine (rutinosyl-3 kaempférol)	52	-
isoquercitrine (glucosyl-3 quercétine)	49	8, 2
rutine (rutinosyl-3 quercétine)	31	-
quercitrine (rhamnosyl-3 quercétine)	74	12, 8
U uniformément marqué.		

4.3.5. Enfin, chez Prunus Mahaleb, le métabolisme des composés flavoniques semble assez lent.

Protocole expérimental.

1. ISOLEMENT ET PURETES DES COMPOSES.

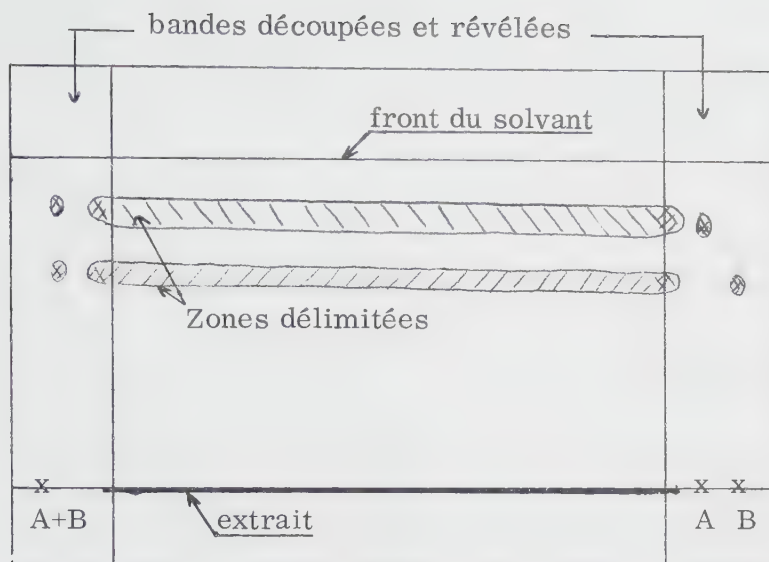
1.1. Isolement des composés

Dans chaque expérience, les feuilles sont détachées des rameaux. La fraction de rameau étudiée est la partie délimitée entre le point d'injection et la section ne donnant aucune radioactivité avec un tube Geiger dont la fenêtre a une épaisseur de 1,7 mg par cm². La longueur de cette fraction varie en général de 40 à 70 cm, suivant la durée de l'expérience.

La portion de branche ainsi délimitée est coupée en petits fragments de 0,5 cm qui sont broyés à l'aide d'un moulin à café. La poudre de bois ainsi obtenue est pesée, puis épuisée une fois à l'éthanol à froid pendant 24 heures et deux fois à l'éthanol à chaud. Les extraits alcooliques sont réunis et concentrés sous vide jusqu'à 20 ml environ. Le volume de cette solution est mesuré exactement ; une partie aliquote, en général deux fois 1 ml, est séchée dans deux coupelles tarées, en aluminium, à l'aide d'une lampe infra-rouge. Le résidu sec obtenu est pesé ; la moyenne des deux poids secs permet de déterminer le poids sec de l'extrait initial.

La solution restante est fractionnée par chromatographie sur bandes de papier Whatman n° 1 ou n° 4 (largeur 40 cm), à raison de 10 mg d'extrait sec par bande. La technique est la suivante :

L'extrait est déposé à l'aide d'une micropipette, sous forme d'un trait, sur une longueur de 30 à 35 cm ; à une extrémité, sont déposés les composés étudiés purs, à l'autre, le mélange de ces composés. Les bandes sont développées, puis révélées en lumière ultra-violette ; les zones fluorescentes sont délimitées. Pour les substances non fluorescentes, deux bandes de 5 à 8 cm de largeur sont découpées à chaque extrémité et révélées soit avec une solution de FeCl₃ à 5 % dans l'acide acétique, soit avec une solution d'acide sulfanilique diazoté ; dans ce dernier cas, les bandes encore humides sont exposées aux vapeurs d'ammoniac qui ont pour but d'accentuer la coloration. Les zones ayant même R_f que les corps de référence sont délimitées, puis découpées.



Chromatogramme

Chaque zone est découpée en minces fragments qui sont épuisés au Soxhlet par de l'éthanol pendant 4 à 8 heures. Les extraits alcooliques sont à nouveau concentrés et soumis à une deuxième chromatographie sur papier, selon le protocole décrit ci-dessus. Le développement s'effectue avec un système de solvants différents. Il faut en général faire trois à quatre chromatographies successives dans des systèmes de solvants différents pour isoler la substance à l'état pur.

1.2. Puretés des composés.

Les puretés chimique et radiochimique des composés isolés sont déterminées.

1.2.1. Pureté chimique (voir chapitre II).

La pureté chimique est établie :

- par chromatographie sur papier avec la substance de référence,
- par les réactions colorées,
- par le point de fusion et le P.F. mélangé avec la substance de référence, lorsque le composé isolé est suffisamment abondant,

- par spectrométrie ultraviolette. En général, les substances obtenues, surtout si elles sont en faible quantité, sont souillées par des fibres de cellulose provenant de papier de chromatographie ; c'est pourquoi le dosage des substances obtenues doit être effectué par spectrométrie U.V., mesure exacte de la densité optique au maximum d'absorption des composés.

Il a été vérifié au préalable que la densité optique au maximum d'absorption était proportionnelle aux concentrations de ces substances, entre les limites de concentration 0,5 et 2 mg pour 100 ml d'éthanol à 95°.

1.2.2. Pureté radiochimique.

La pureté radiochimique des composés isolés est établie :

- par enregistrement de la radioactivité le long du chromatogramme. Un seul pic, de même R_f que l'échantillon de référence, doit être trouvé,

- par dilution isotopique : la chute des activités spécifiques moléculaires doit être identique au rapport de dilution du composé isolé radioactif par la même molécule inerte,

- par transformation du corps radioactif isolé (lorsque celui-ci est suffisamment abondant) en dérivé caractéristique (exemple : transformation des flavanonols en flavonols). Les activités spécifiques moléculaires des deux composés doivent être identiques.

1.3. Mesure de la radioactivité.

La détermination de la radioactivité d'un composé - faite par la méthode de placage direct (couche infiniment mince : épaisseur $\approx 0,2$ mg par cm^2) - s'effectue, sauf indication contraire, à l'aide d'un compteur Geiger 2 Π à écoulement gazeux (rendement 48 % pour le ^{14}C et ^{35}S).

Chaque valeur de radioactivité donnée est la moyenne de comptage de deux coupelles différentes du même composé ; une troisième coupelle est nécessaire si les deux valeurs trouvées précédemment diffèrent de plus d'un écart quadratique moyen σ (*).

Les valeurs de la radioactivité des substances seront données à $\pm 1 \sigma$.

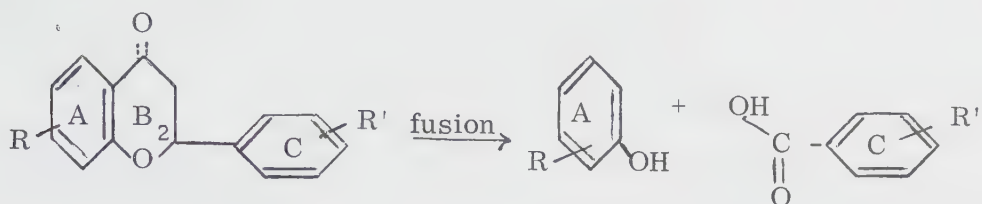
(*) σ est déterminé par la formule : $\sigma = \frac{\sqrt{N}}{t}$

N : nombre d'impulsions comptées

t : temps de comptage.

1.4. Localisation de l'atome radioactif (fusion alcaline).

La détermination de la position de l'atome radioactif dans les composés flavoniques isolés s'effectue à l'aide de la technique mise au point par C. MENTZER et Mlle MAURICE (80), par micro-fusion alcaline.



5 mg environ du composé flavonique sont placés dans un tube à hémolyse avec une pastille de KOH. Le tube est balayé par un courant d'azote puis plongé dans un bain métallique à 180-200° C., pendant 3 minutes. Le tube est rapidement refroidi puis plongé dans un bain de glace. La masse solide est acidifiée à pH 1 avec HCl 3N et le courant d'azote est stoppé. La solution aqueuse est extraite trois fois avec 3 ml d'éther humide. Les solutions étherées sont réunies et extraites trois fois avec 2 ml d'une solution à 5 % de NaCO₃H. La solution bicarbonatée est acidifiée à pH 2 et extraite trois fois avec 3 ml d'éther. Les solutions étherées qui contiennent l'acide benzoïque (correspondant au cycle C et au C₂ du composé étudié) sont concentrées sous vide et soumises à la chromatographie de partage sur papier.

La solution étherée initiale extraite au bicarbonate et renfermant le polyphénol correspondant au cycle A du composé étudié est également concentrée puis soumise à la chromatographie de partage sur papier.

La révélation des produits de fusion est faite par fluorescence ultraviolette et avec l'acide sulfanilique diaoté, puis exposition de la bande de papier aux vapeurs d'ammoniac.

Les zones correspondant aux produits de fusion (acides benzoïques et polyphénols) sont reportées sur la partie non révélée du chromatogramme. Les produits sont ensuite élués à l'alcool et dosés à leur maximum d'absorption par spectrométrie ultraviolette (Beckman, modèle DU).

2. INCORPORATION DE L'ACIDE TRANS-CINNAMIQUE ^{14}C -3, CHEZ ROBINIA PSEUDOACACIA.

2.1. Injection.

16 mg de cinnamate de potassium ^{14}C - 3, d'activité spécifique $250 \mu\text{C mM}^{-1}$, dissous dans 10 ml d'eau distillée, sont administrés, selon la technique préconisée par C. MENTZER (81), le 11 Mai 1963, à l'extrémité d'une branche latérale d'un jeune plant de *Robinia pseudoacacia* (hauteur du jeune arbre : 1 m).

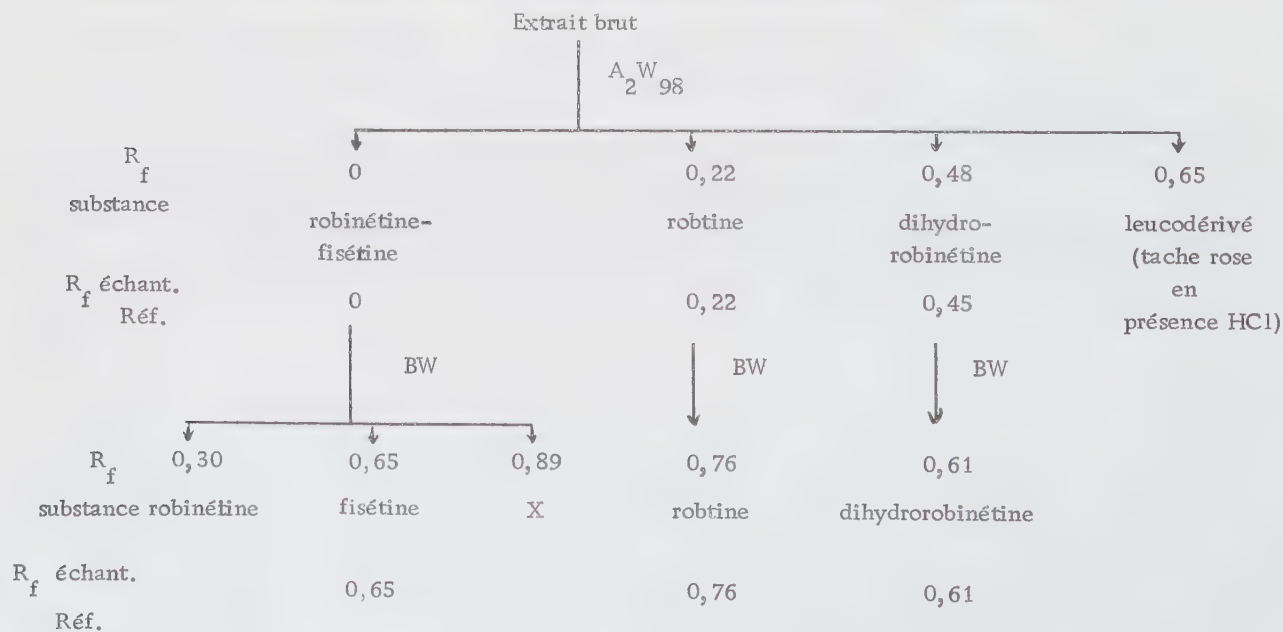
Un jour après le début de l'injection, la solution radioactive est complètement absorbée. Le 19 mai, soit 8 jours après le début de l'expérience, le plant est coupé. Les feuilles (29 g) sont séparées des rameaux (43 g).

2.2. Etude des rameaux.

Les rameaux, finement broyés, sont épuisés par l'éthanol, d'abord à froid (1 x 100 ml), ensuite à chaud (2 x 100 ml). Les solutions alcooliques sont réunies et évaporées sous vide. Le concentré est ajusté à 20 ml. 1 ml de cette solution, déposé sur une coupelle tarée, est évaporé à sec à l'aide d'une lampe infrarouge. Poids du résidu sec : 3,75 mg (radioactivité 5700 cpm mg^{-1}). Le poids de résidu sec de l'extrait total est donc de 75 mg.

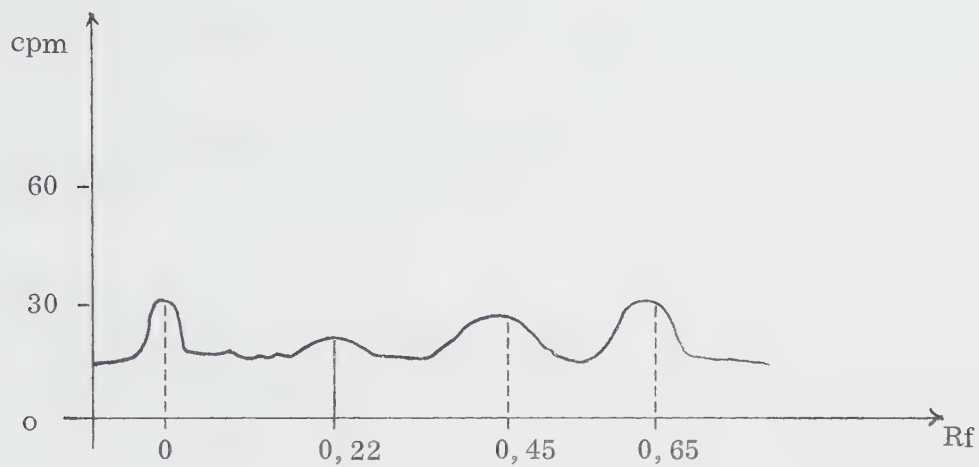
2.2.1. Fractionnement de l'extrait.

Schéma de fractionnement par chromatographie sur papier Whatman n° 4

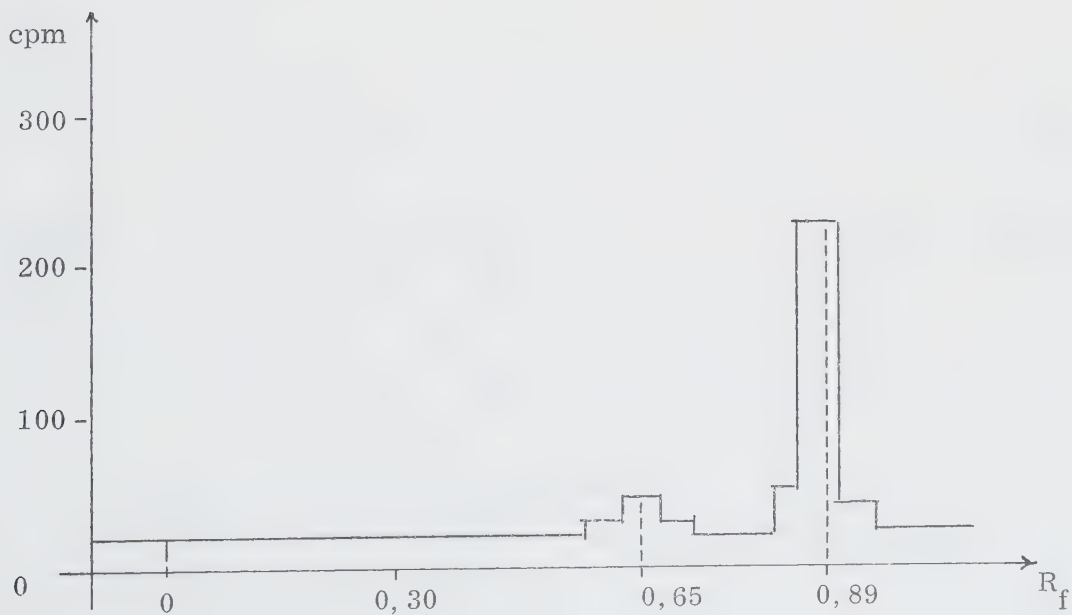


Enregistrement de la radioactivité le long des chromatogrammes.

- Extrait brut développé dans A_2W_{98} (tube TG C_2 1,7 mg/cm²)



- Tache R_f 0 du chromatogramme précédent développée dans BW (compteur Geiger sans fenêtre) - compté cm par cm.



2.2.2. Etude des différents composés.

2.2.2.1. Robinétine.

La quantité de robinétine obtenue après deux chromatographies successives est très faible, de l'ordre de 0,1 mg. Après 10 heures de comptage, aucune radioactivité n'a pu être décelée dans ce composé.

Nombre de coups trouvé en 10 heures : 19.500 ± 140

Mouvement propre de l'appareil : 19.300 ± 140

2.2.2.2. Fiséline.

Ce composé est en quantité très faible ; il n'a été décelé que par chromatographie mais, comme le montre l'enregistrement de la radioactivité, il semble radioactif.

2.2.2.3. Corps X (R_f 0 dans A_2W_{98} , R_f 0,89 dans BW)

Ce composé est également en quantité très faible mais semble très radioactif ; d'après les travaux de ROUX et PAULUS (117) et son comportement chromatographique, il peut s'agir soit du dihydroxy-7,4' flavonol, soit de la trihydroxy-4,2',4' chalcone.

Il est évident qu'il serait très intéressant d'approfondir cette étude, s'il s'agit effectivement de la trihydroxy-4,2',4' chalcone, en suivant l'évolution de la radioactivité de cette substance comparativement à celle des autres composés, en fonction du temps. Une telle étude se poursuit au laboratoire.

2.2.2.4. Robtine.

5 mg de robtine obtenus sont dilués avec 7,2 mg de robtine inerte (dilution $\rho = 1/2,44$) et dissous avec 2 ml d'eau. Après 2 jours, 3 mg de cristaux sont essorés et séchés sous vide à $110^\circ C$.

F. : $275^\circ C$

Spectre U.V. dans l'alcool : max. 234, 276, 313 m μ .

Une deuxième cristallisation étant pratiquement impossible, la pureté radiochimique de la robtine a été établie en comparant les activités spécifiques de

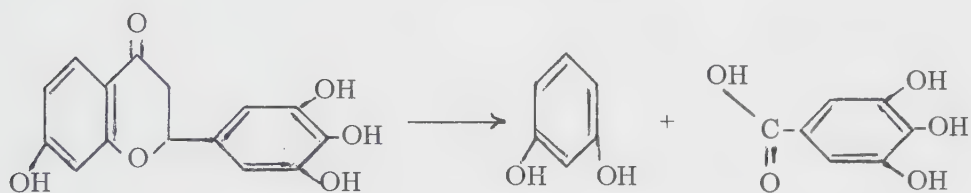
la robtine cristallisée : $102 \pm 5 \text{ cpm mg}^{-1}$ et du produit contenu dans les eaux-mères de cristallisation : $96 \pm 5 \text{ cpm mg}^{-1}$.

L'activité de la robtine isolée initialement était donc de $67.500 \pm 3.400 \text{ cpm mM}^{-1}$.

La dilution activité spécifique cinnamate/activité spécifique robtine par rapport à l'acide cinnamique administré est donc : $\delta 4.000$.

Par concentration des eaux-mères de cristallisation, il est possible d'obtenir encore 3 mg de robtine (activité : $97 \pm 5 \text{ cpm mg}^{-1}$).

- Fusion alcaline.



5 mg de robtine sont soumis à la fusion alcaline. Les extraits étherés sont chromatographiés dans A₂W₉₈ Après développement, les zones correspondant à l'acide gallique, R_f 0,40, et à la résorcine, R_f 0,75, sont éluées, dosées et leurs activités spécifiques déterminées. Les résultats obtenus sont les suivants :

	quantité obtenue en mg	radioactivité	
		cpm mg ⁻¹	cpm mM ⁻¹
acide gallique	0,4	157 ± 5	26.800 ± 800
résorcine	0,5	0	0

La concordance des activités spécifiques moléculaires :

de la robtine	d'une part	27.600 ± 1.350
de l'acide gallique	d'autre part	26.800 ± 800

permet de conclure que l'atome de C radioactif est, selon toute vraisemblance, le carbone 2 de la robtine.

2.2.2.5. Dihydrorobinétine.

Ce flavanonol étant particulièrement oxydable, 0,75 mg seulement de dihydrorobinétine sont obtenus après élution des bandes de papier provenant de la deuxième chromatographie. Ce composé semble très radioactif.

36,75 mg de dihydrorobinétine inerte sont ajoutés aux 0,75 mg de dihydrorobinétine radioactive ($\rho = 1/50$) et cristallisés dans 5 ml d'eau. Après un jour 27 mg de dihydrorobinétine cristallisés sont obtenus (activité 61 ± 2 cpm mg^{-1}). Ces 27 mg sont cristallisés une deuxième fois dans 2,5 ml d'eau ; après un jour, 5,5 mg de dihydrorobinétine sont obtenus (activité 58 ± 2 cpm mg^{-1}).

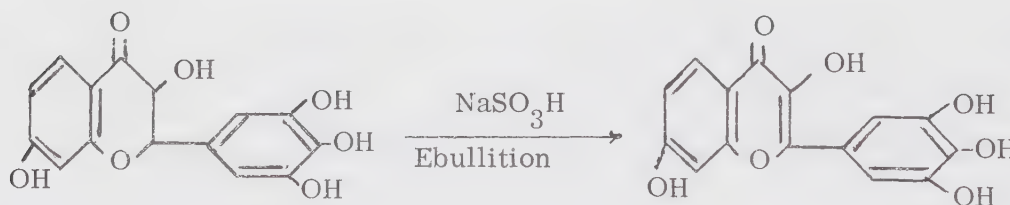
F. : 225°C (corps de référence : 225°C).

Spectre U.V. dans l'alcool : max. 276-327 $\text{m}\mu$, inflexion 230 $\text{m}\mu$.

L'activité spécifique de la dihydrorobinétine isolée initialement était donc : 912.000 ± 32.000 cpm mM^{-1} .

dilution par rapport au cinnamate injecté : $\delta \approx 280$.

- Oxydation de la dihydrorobinétine en robinétine.



Cette oxydation a été réalisée selon la technique décrite par HERGET et GOLDSCHMID qui consiste à porter à l'ébullition, pendant 3 heures, une solution aqueuse à 10 % de bisulfite de sodium contenant le flavanonol ; au cours de l'opération, le flavonol formé précipite.

Aux eaux-mères de la deuxième cristallisation, sont ajoutés 50 mg de NaSO₃H puis on porte à l'ébullition pendant 2 heures. Le précipité jaune est essoré et cristallisé dans 5 ml d'éthanol. Après une nuit, 8 mg de cristaux sont obtenus.

F. Déc : 330° C, robinétine : 330° C.

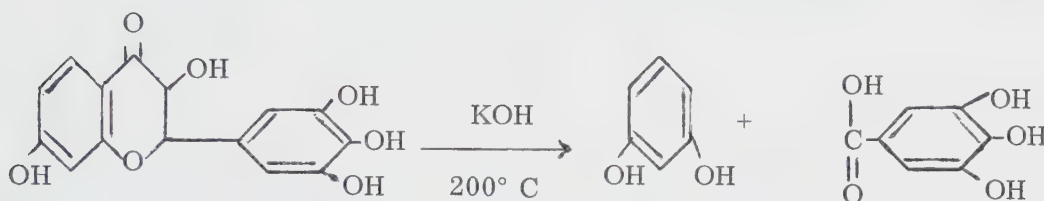
Spectre U.V. dans l'alcool : max. 255-320-370 mμ .

R_f dans BW : 0,3, robinétine témoin : 0,30.

Activité spécifique : 59 ± 2 cpm mg⁻¹, soit 17.800 ± 750 cpm mM⁻¹

Activité spécifique dihydrorobinétine 18.100 ± 750 cpm mM⁻¹.

- Fusion alcaline de la dihydrorobinétine.



La microfusion alcaline a été effectuée sur 5,5 mg de dihydrorobinétine, suivant la même technique que celle décrite pour la robtine. Les résultats sont les suivants :

	quantité obtenue	radioactivité	
	en mg	cpm mg ⁻¹	cpm mM ⁻¹
acide gallique	0,41	102 ± 3	17.300 ± 500
résorcine	0,60	0	0

L'activité de la dihydrorobinétine étant de 18.100 ± 750 , ici encore, l'atome ¹⁴C est localisé en position 2 dans la dihydrorobinétine.

2.2.2.6. Leucodérivé, de R_f 0,68 dans A₂W₉₈.

Les zones correspondant à ce R_f sont éluées avec du n-propanol (50 ml) à froid. 12 ml de HCl 3 N sont ajoutés et la solution portée au reflux pendant 1 heure. La solution rose est alors concentrée sous vide et chromatographiée sur papier Whatman n° 4 dans acide formique-HCl (50:50), en présence de l'anthocyane provenant du (+) tétrahydroxy-7,3',4',5' flavanediol-3,4 et de l'anthocyane provenant de la fustine qui a été traitée selon le test mis au point par PACHECO (92,99). Les R_f obtenus sont les suivants :

Chlorure de pentahydroxy-3, 7, 3', 4', 5' flavylum	0, 45
Chlorure de tétrahydroxy-3, 6, 3', 4' flavylum	0, 60
Chlorure de flavylum isolé	0, 68

L'enregistrement de la radioactivité le long du chromatogramme a donné un seul pic de R_f 0, 68. Une étude d'identification est en cours au laboratoire. Il semblerait que l'anthocyane isolé est moins hydroxylé que ceux testés ; cependant ROUX (116) n'a pas trouvé de leucodérivés moins hydroxylés chez Robinia pseudoacacia. Il faut remarquer que l'expérience est faite sur un jeune plant qui peut avoir une composition légèrement différente de l'arbre adulte.

2.3. Etude des feuilles.

HATTORI (62) a isolé dans les feuilles de Robinia pseudoacacia la rhamnosidoglucosyl-7 acacétine ou rhamnosidoglucosyl-dihydroxy-5, 7 méthoxy-4' flavone, puis FREUDENBERG et HARTMANN (33) isolèrent un trioside de l'acacétine.

Ces glucosides sont extraits des feuilles par de l'acétone bouillant (3 x 150 ml). Le résidu sec (680 mg), obtenu après concentration des extraits acétoniques, est hydrolysé par 100 ml d'acide chlorhydrique 2 N, porté à l'ébullition pendant 2 heures. Le précipité est filtré puis recristallisé dans l'alcool éthylique. Après 2 jours, les cristaux jaune pâle obtenus sont essorés et recristallisés dans l'alcool une nouvelle fois. 3, 5 mg d'acacétine sont obtenus.

F. 260° C - Litt. 260-262° C.

Spectre U.V. dans l'alcool : max. 273-330 m μ .

R_f dans acide acétique-eau (60:40) : 0, 74, acacétine témoin 0, 74.

Aucune radioactivité n'a pu être décelée dans cette flavone.

En résumé, l'acide cinnamique ^{14}C - 3 s'incorpore chez Robinia pseudoacacia dans la robtine (dilution δ - 4.000), dans la dihydrorobinéline (dilution δ = 280), dans la fisétine. La position de l'atome de C radioactif dans les deux premiers composés est en 2 comme le montre la microfusion alcaline. Par contre, 8 jours après l'injection, la robinéline contenue dans le bois et l'acacétine contenue dans les feuilles ne semblent pas être radioactives.

3. INCORPORATION DE L'ACIDE TRANS CINNAMIQUE ^{14}C - 3 CHEZ PRUNUS AVIUM

3.1. Injection.

L'expérience a été réalisée sur un jeune arbre de 4 m de hauteur. 10 mg de trans-cinnamate ^{14}C - 3 de potassium (activité spécifique 250 $\mu\text{C}/\text{mM}$), dissous dans 10 ml d'eau, sont injectés à l'extrémité d'une branche latérale (longueur 2 m), le 30 mai 1963. Le 9 juillet, soit 41 jours après l'injection, la branche est coupée à 45, 64 et 74 cm à partir du point d'injection, de manière à obtenir trois fragments A, B, C, de longueurs respectives 45, 19 et 10 cm. Les feuilles sont détachées des trois fragments obtenus.

3.2. Etude du bois.

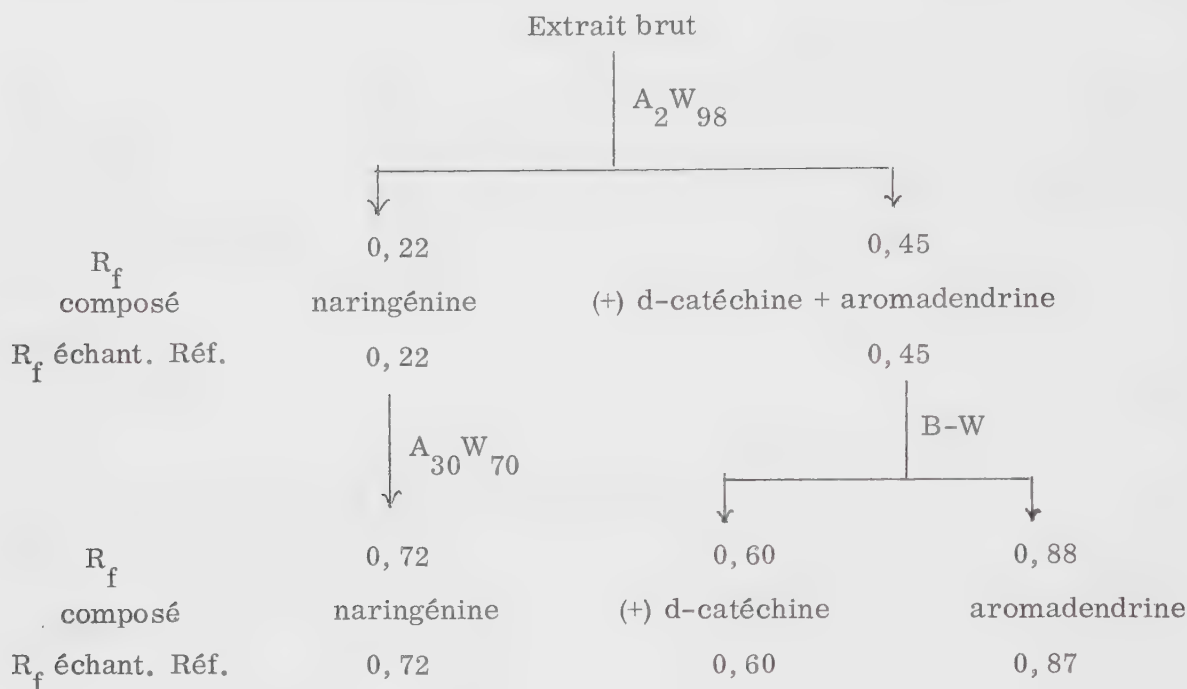
Chaque fragment A, B, C est broyé séparément et jeté dans 200 ml d'éther. Trois épuisements étherés sont effectués sur chaque fraction. Les extraits étherés de chaque fraction A, B, C sont réunis et concentrés à sec. Le résidu sec est pesé et la radioactivité mesurée.

fraction	poids du fragment de branche	poids du résidu sec	radioactivité cpm mg^{-1}
A	20 g	192 mg	2.300
B	21 g	170 mg	1
C	15 g	105 mg	0

Seule la fraction A a été traitée.

3.2.1. Fractionnement de l'extrait.

Schéma de fractionnement par chromatographie sur papier Whatman n° 4



Les taches sont révélées avec l'acide sulfanilique diazoté, puis le chromatogramme est exposé aux vapeurs d'ammoniac.

3.2.2. Etude des différents composés.

3.2.2.1. d-catéchine.

Il est possible, après élution des zones de R_f 0,60, dans B-W, d'isoler 9 mg de d-catéchine. Avec COMTE, ZWINGELSTEIN, FAVRE-BONVIN et MENTZER (25), nous avons déjà montré que l'acide cinnamique $^{14}\text{C} - 3$ s'incorporait dans le carbone 2 de la catéchine, chez Prunus avium.

Au 9 mg de catéchine obtenus, 37 mg de d-catéchine inerte sont ajoutés ($\rho = 1/5, 1$), puis le mélange est dissous dans 5 ml d'eau. La solution est filtrée et concentrée à 2 ml. Après 1 jour au réfrigérateur, 15 mg de petites aiguilles blanches sont essorés et séchés sous vide à 100°C .

F. : 175° C - F. Mélangé avec catéchine inerte : 175° C.

Spectre U.V. dans l'alcool : max. 278 m μ .

Radioactivité : 67 ± 2 cpm mg⁻¹

L'activité de la catéchine isolée était donc de :

342 ± 12 cpm mg⁻¹, soit 102.600 ± 3.000 cpm mM⁻¹

dilution par rapport à l'acide cinnamique injecté : $\delta = 2.400$.

Avec COMTE, nous avons trouvé : 300 comme dilution par rapport à l'acide cinnamique, après 8 et 30 jours, chez de jeunes plants.

3.2.2.2. Aromadendrine.

Après fractionnement sur bandes de papier, 17 mg d'aromadendrine sont isolés (activité : 50 cpm mg⁻¹ - 14.400 ± 500 cpm mM⁻¹). 34 mg d'aromadendrine pure inerte sont ajoutés ($\rho = 1/3$) et le mélange cristallisé dans 15 ml d'un mélange hydro-alcoolique (50:50). 25 mg de cristaux sont obtenus.

F. : 237-239° C. - F. mélangé avec aromadendrine : 238-239° C.

Spectre U.V. dans l'éthanol : max. 292 m μ .

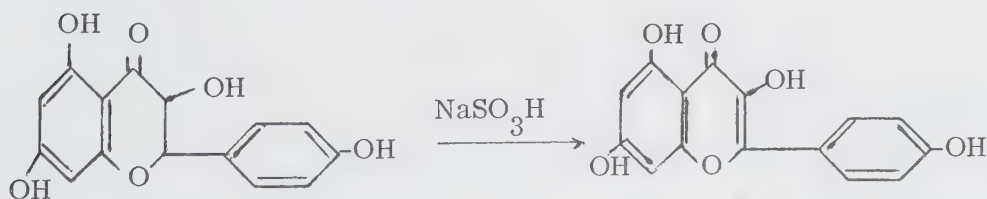
Activité : 17 cpm mg⁻¹ $\pm 0,5$ - 4.900 ± 150 cpm mM⁻¹

En tenant compte de la dilution : 5,1 $\pm 1,5$ cpm mg⁻¹ - 14.700 ± 500 cpm mM⁻¹.

Dilution par rapport à l'acide cinnamique : $\delta = 17.000$.

La correspondance des activités spécifiques avant et après dilution est en faveur de la pureté radiochimique du corps isolé.

- Oxydation de l'aromadendrine en kaempférol.



10 mg d'aromadendrine sont oxydés en kaempférol par une solution de bisulfite de sodium, suivant la technique décrite précédemment. Le kaempférol obtenu est cristallisé dans l'alcool ; 5 mg de cristaux sont obtenus.

F. : 275° C - littérature : 275-277° C.

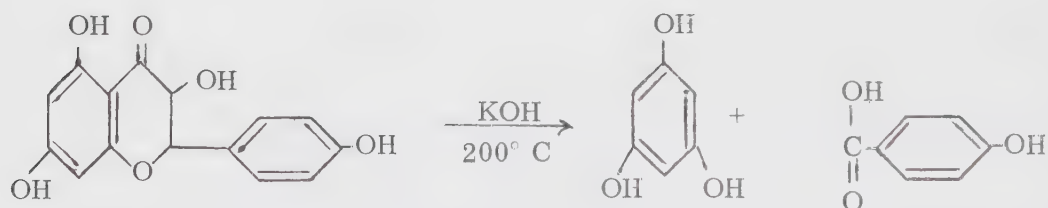
Spectre U.V. dans l'alcool : max. 266-368 mμ .

Radioactivité : 16 ± 1 cpm mg⁻¹ - 4.600 ± 250 cpm mM⁻¹.

La chromatographie sur papier ne donne qu'une seule tache, fluorescente en jaune en présence de lumière ultraviolette.

Solvant	kaempférol radioactif	kaempférol témoin
n-butanol-acide acétique-eau (4:1:5)	0,87	0,88
n-butanol saturé d'eau	0,81	0,81

- Fusion alcaline de l'aromadendrine.



La microfusion alcaline, effectuée sur 6 mg d'aromadendrine, a donné les résultats suivants :

	R _f B ₇₀ A ₁₈ W ₁₂	quantité obtenue en mg	radioactivité	
			cpm mg ⁻¹	cpm mM ⁻¹
ac. parahydroxy-benzoïque	0,86	1,4	36 ± 1	4970 ± 150
phloroglucine	0,63	1,2	0	0

Pour les mêmes raisons que celles évoquées précédemment, l'atome radioactif, dans l'aromadendrine isolée, doit être en position 2.

3.2.2.3. Naringénine.

L'élution des zones de même R_f que la naringénine témoin, à la suite de la deuxième chromatographie, par du méthanol, donne 3,5 mg d'un produit blanc, ayant même spectre U.V. que la naringénine (max. 288 m μ).

Radioactivité : 240 ± 6 cpm mg⁻¹.

Les 3,5 mg obtenus sont cristallisés avec 14 mg de naringénine inerte ($\rho = 1/5$), dans 2 ml d'un mélange hydroalcoolique (50:50). Le composé cristallise sous forme de petites aiguilles blanches (6 mg).

F. : 248-250° C - F. naringénine : 250° C.

Spectre U.V. dans l'alcool : max. 288 m μ .

Activité : $48,5 \pm 1,5$ cpm mg⁻¹ - 13.200 ± 400 cpm mM⁻¹.

Activité de la naringénine isolée : 243 ± 6 cpm mg⁻¹ - 66.000 ± 2.000 cpm mM⁻¹.

Dilution par rapport à l'acide cinnamique ¹⁴C - 3 : $\delta = 3.800$.

- Fusion alcaline de la naringénine.

5 mg de naringénine radioactive sont soumis à la fusion alcaline. Les résultats sont les suivants :

	quantité obtenue en mg	radioactivité	
		cpm mg ⁻¹	cpm mM ⁻¹
acide parahydroxybenzoïque	1, 2	$98,5 \pm 3$	13.550 ± 400
phloroglucine	1	0	0

L'atome radioactif, dans la naringénine, était bien en position 2.

En résumé, l'acide cinnamique ^{14}C - 3, chez Prunus avium, s'incorpore également dans les flavanones (naringénine) et les flavanonols (aromadendrine) dont le noyau A dérive de la phloroglucine. La position de l'atome radioactif, dans le flavonoïde, est bien en position 2.

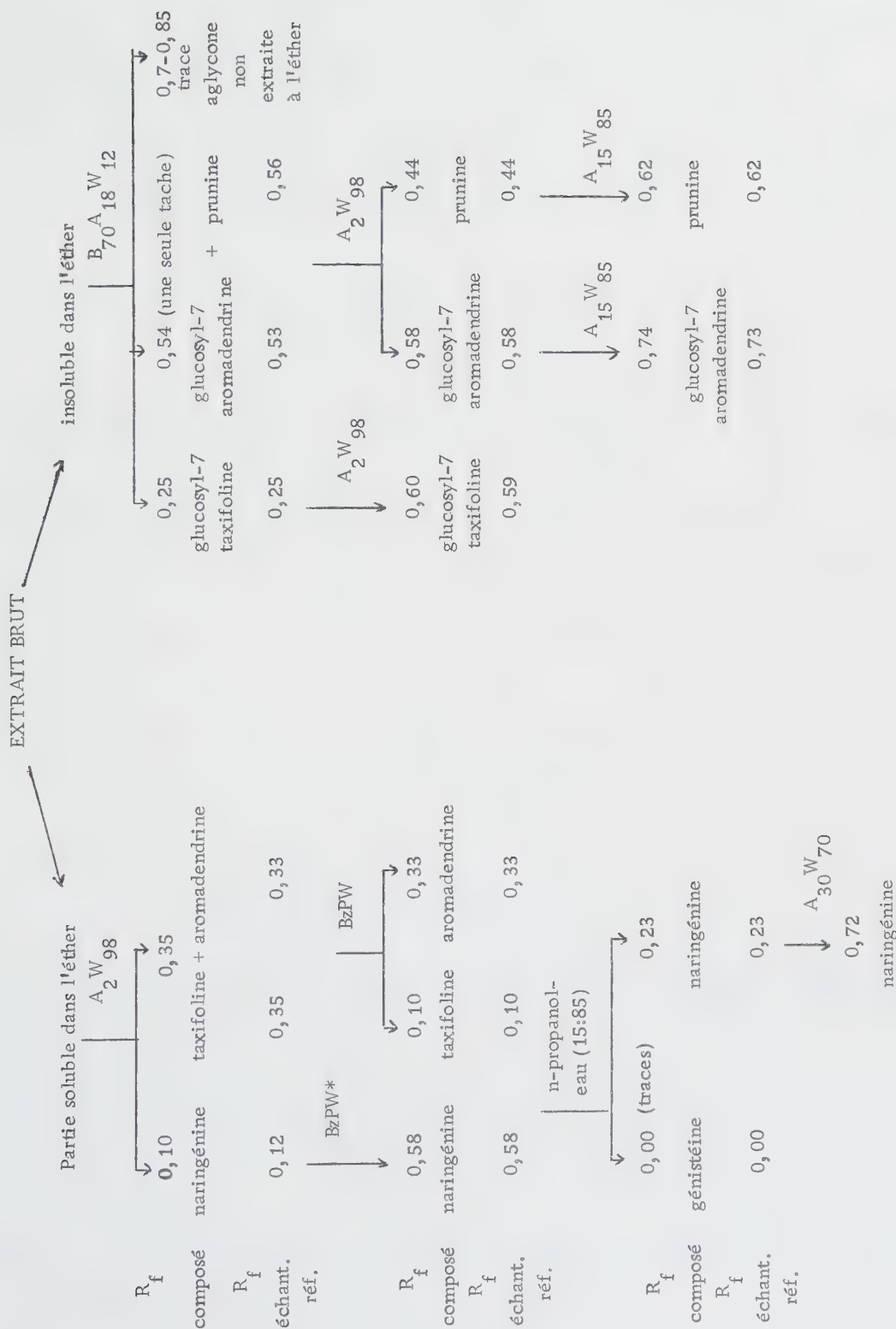
4. INCORPORATION DE L'ACIDE TRANS CINNAMIQUE ^{14}C - 3 ET DE L'ACIDE PHENYL-PYRUVIQUE ^{14}C - 3, DANS LES COMPOSES FLAVONIQUES DE PRUNUS MAHALEB.

4.1. Injection.

Les injections des acides cinnamique et phényl-pyruvique ont été pratiquées aux extrémités de deux branches différentes (longueur 1,5 m) d'un même Prunus Mahaleb. (hauteur 4 m environ). 58 jours après l'injection, les produits extraits provenant des portions de branches situées près du tronc ne sont pas radioactifs. Cette vérification a été faite de manière à rejeter l'hypothèse d'un échange possible de substances radioactives entre les deux branches traitées.

4.2. Fractionnement des extraits.

Schéma général de fractionnement par chromatographie sur papier Whatman n° 1, utilisé pour tous les extraits de Prunus Mahaleb.



(*) $BzPW$: Benzène-acide propionique-eau (2:2:1)

4.3. Expérience faite avec le trans cinnamate ^{14}C - 3 de potassium.

16,5 mg de trans cinnamate de potassium ^{14}C - 3 (As 250 μC mM^{-1}), dissous dans 10 ml d'eau, sont administrés à l'extrémité d'une branche C (longueur 1,65 m) de Prunus Mahaleb, le 1 mai 1964. 58 jours après l'injection, la branche C est coupée. La limite de la radioactivité décelable avec un compteur Geiger portable (épaisseur de la fenêtre 1,7 mg/cm^2) se situe à environ 50 cm après le point d'injection. Seule cette portion de branche ainsi délimitée a été traitée.

Poids de la branche sans les feuilles : 62 g,

Poids des produits extraits à l'alcool : 3,5 g.

Le résidu sec est ensuite extrait 5 fois par 50 ml d'éther à froid. Les extraits étherés réunis sont concentrés sous vide - poids du résidu sec obtenu : 0,25 g.

Les deux extraits secs (soluble dans l'éther - insoluble dans l'éther) sont soumis à la chromatographie sur papier, selon le schéma donné ci-dessus.

4.3.1. Etude des différents composés.

4.3.1.1. Glucosyl-7 taxifoline.

3,1 mg de glucosyl-7 taxifoline sont obtenus.

Spectre U.V. dans l'alcool : max. 284 $\text{m}\mu$ - inflexion à 220 $\text{m}\mu$.

Réaction colorée : $\text{Zn} + \text{HCl}$: lilas.

Radioactivité : $3.500 \pm 100 \text{ cpm mg}^{-1}$, soit $1600\,000 \pm 50\,000 \text{ cpm mM}^{-1}$.

Dilution par rapport à l'acide cinnamique : $\delta = 156$.

- Oxydation en glucosyl-7 quercétine (querciméritrine).

3 mg de glucosyl-7 taxifoline sont dissous dans 2,5 ml d'eau contenant 10 mg de NaSO_3H . Après 2 heures de reflux, la solution devenue jaune or est refroidie. Aucun précipité n'apparaît. La solution est alors concentrée environ de moitié, puis chromatographiée sur une bande de papier Whatman n° 1 (largeur 26 cm), avec un spot de glucosyl-7 quercétine de référence, dans $B_{70}A_{18}W_{12}$.

Après développement, le chromatogramme est séché, puis examiné en lumière U.V. Une bande de fluorescence jaune, de R_f 0,17, est délimitée.

R_f glucosyl-7 quercétine 0,17. Cette zone est éluée au soxhlet à l'alcool, pendant 24 heures. L'élution est assez difficile car ce glucoside a tendance à rester fixé sur la bande de papier, surtout si celle-ci est sèche.

Spectre U.V. dans l'alcool : max. 257 et 372 m μ .

obtenu : 1,65 mg - Rendement : 53 %.

Radioactivité : 3.140 ± 100 cpm mg⁻¹, $1\,500\,000 \pm 50\,000$ cpm mM⁻¹

- Hydrolyse de la glucosyl-7 quercétine.

La totalité de la glucosyl-7 quercétine est dissoute dans un mélange éthanol, 4 ml, HCl 1,5 N, 4 ml, puis portée 4 heures au reflux. L'alcool est ensuite chassé sous vide et la solution aqueuse extraite trois fois par 4 ml d'éther. L'éther est chassé sous vide et le résidu jaune dissous dans l'éthanol, 5 ml. Le spectre U.V. de la solution alcoolique est identique à celui de la quercétine. Obtenu : 0,175 mg - Rendement : 16 %.

A cette solution, 16,2 mg de quercétine pure inerte sont ajoutés ($\rho = 1/93,5$). Le mélange, après cristallisation, abandonne 8 mg de cristaux, F. 314-315° - quercétine témoin F. 314-316°.

Radioactivité : 56 ± 2 cpm mg⁻¹, soit 16.900 ± 680 cpm mM⁻¹

Radioactivité de la quercétine obtenue avant dilution :

5.200 ± 400 cpm mg⁻¹, soit $1.570.000 \pm 63.000$ cpm mM⁻¹.

- Fusion alcaline de la quercétine.

5 mg de quercétine radioactive sont soumis à l'épreuve de la fusion alcaline, suivant la technique déjà décrite. La phloroglucine et l'acide protocatéchique obtenus sont purifiés par chromatographie sur papier Whatman n° 1 dans B₇₀A₁₈W₁₂ - R_f respectifs : 0,64 et 0,78.

Les résultats obtenus sont les suivants :

	quantité obtenue en mg	rendement	radioactivité	
			cpm mg ⁻¹	cpm mM ⁻¹
ac. protocatéchique	1,05	40 %	116 ± 5	17850 ± 750
phloroglucine	0,8		0	0

D'après les résultats trouvés, il peut être déduit :

a) que la glucosyl-7 taxifoline est radiochimiquement pure. Les activités spécifiques de la glucosyl-7 quercétine et de la quercétine sont à peu près constantes.

	glucosyl-7 taxifoline	glucosyl-7 quercétine	quercétine
AsM	$1.600.000 \pm 50.000$	$1.500.000 \pm 50.000$	$1.570.000 \pm 63.000$

b) que toute la radioactivité de la glucosyl-7 taxifoline semble être localisée sur le C₂ de la taxifoline.

	quercétine	acide protocatéchique
AsM	16.900 ± 680	17.850 ± 750

4.3.1.2. Glucosyl-7 aromadendrine.

3,4 mg de glucosyl-7 aromadendrine sont obtenus.

Spectre U.V. dans l'alcool : max. 285 m μ .

Réaction colorée : Zn + HCl : rouge

Radioactivité 3.200 ± 100 cpm mg⁻¹, $1.475.000 \pm 55.000$ cpm mM⁻¹

dilution par rapport à l'acide cinnamique : $\delta = 169$.

La glucosyl-7 aromadendrine a été oxydée en glucosyl-7 kaempférol qui, à son tour, a été hydrolysé en kaempférol. Ce flavonol a été soumis à la fusion alcaline. Les techniques sont identiques à celles utilisées pour la glucosyl-7 taxifoline.

- Oxydation en glucosyl-7 kaempférol (populnine).

L'oxydation de 3 mg de glucosyl-7 aromadendrine a donné 1,5 mg de glucosyl-7 kaempférol (Rdt. 50 %).

Spectre U.V. dans l'alcool : 265, 327, 369 m μ .

R_f dans B₇₀A₁₈W₁₂ : 0,45

Radioactivité, 3.100 ± 100 cpm mg⁻¹, $1.426.000 \pm 50.000$ cpm mM⁻¹.

- Hydrolyse du glucosyl-7 kaempférol.

L'hydrolyse acide du glucosyl-7 kaempférol permet d'obtenir 0,2 mg de kaempférol qui, cristallisés avec 12 mg de kaempférol ($\rho = 1/60$) inerte dans 2 ml d'alcool fournissent 6 mg de kaempférol cristallisé.

F. 275-6° C - F. Kaempférol pur : 276° C.

Radioactivité, $84 \pm 3 \text{ cpm mg}^{-1}$, $24.000 \pm 900 \text{ cpm mM}^{-1}$.

Radioactivité du kaempférol avant dilution :

$5.040 \pm 200 \text{ cpm mg}^{-1}$, $1.450.000 \pm 58.000 \text{ cpm mM}^{-1}$.

- Fusion alcaline du kaempférol.

La fusion alcaline, effectuée sur 5 mg de kaempférol, a donné les résultats suivants :

	Quantité obtenue en mg	rendement	radioactivité	
			cpm mg^{-1}	cpm mM^{-1}
acide parahydroxy- benzoïque	1,2	50 %	175 ± 7	24.200 ± 900
phloroglucine	1		0	0

En résumé :

	glucosyl-7 aromadendrine	glucosyl-7 kaempférol	kaempférol
AsM	$1.475.000 \pm 55.000$	$1.426.000 \pm 50.000$	$1.450.000 \pm 58.000$
	kaempférol dilué	acide parahydroxybenzoïque	
AsM	24.000 ± 900	24.200 ± 900	

Ce tableau montre que l'acide cinnamique s'incorpore dans la glucosyl-7 aromadendrine et que l'atome de C radioactif est en 2.

4.3.1.3. Prunine ou glucosyl-7 naringénine.

4,1 mg de prunine sont obtenus.

Spectre U.V. dans l'alcool : max. 213, 284 m μ , plateau à 223-225 m μ .

Réaction colorée : Mg + HCl : rose rouge.

Radioactivité : 2.060 ± 60 cpm mg⁻¹, 920.000 ± 28.000 cpm mM⁻¹

dilution par rapport à l'acide cinnamique : $\delta = 272$.

- Hydrolyse de la prunine en naringénine.

3,8 mg de prunine sont hydrolysés par 2 ml d' HCl N pendant 2 h. à l'ébullition. La naringénine est extraite à l'éther de la solution aqueuse 3 x 2 ml.

Obtenu : 0,8 mg de naringénine qui sont cristallisés avec 15,2 mg de naringénine pure ($\delta = 1,20$) dans 20 ml du mélange (alcool 2 ml - eau 2 ml). 7 mg de naringénine cristallisés sont obtenus.

F. 250° - témoin : 250°

Radioactivité : 165 ± 5 cpm mg⁻¹, 44.900 ± 1.600 cpm mM⁻¹.

Radioactivité de la naringénine obtenue avant dilution :

3.300 cpm mg⁻¹, 900.000 ± 27.000 cpm mM⁻¹.

- Fusion alcaline de la naringénine.

La fusion alcaline a été effectuée sur 5 mg de naringénine. Les résultats sont les suivants :

	Quantité obtenue en mg	radioactivité	
		cpm mg ⁻¹	cpm mM ⁻¹
acide para-hydroxy- benzoïque	0,8	320 ± 10	44.100 ± 1.300
phloroglucine	1	0	0

4.3.1.4. Taxifoline.

Obtenu : 1,1 mg

Spectre U.V. dans l'alcool : max. 290 m μ .

Réaction colorée : Zn + HCl : lilas

Radioactivité : $450 \pm 15 \text{ cpm mg}^{-1}$, $135.000 \pm 4.000 \text{ cpm mM}^{-1}$.

Dilution par rapport à l'acide cinnamique : $\delta = 1.850$.

- Oxydation en quercétine.

0, 8 mg de taxifoline radioactive et 8 mg de taxifoline inerte ($\rho = 1/11$), oxydés par une solution de NaSO_3H fournissent 5 mg de quercétine.

Radioactivité : $43 \pm 2 \text{ cpm mg}^{-1}$, $13.000 \pm 400 \text{ cpm mM}^{-1}$.

soit, en tenant compte de la dilution : $143.000 \pm 4.500 \text{ cpm mM}^{-1}$.

- Fusion alcaline de la quercétine.

4 mg de quercétine obtenus précédemment sont soumis à la fusion alcaline. Les résultats obtenus figurent dans le tableau ci-après.

	poids en mg	radioactivité	
		cpm mg^{-1}	cpm mM^{-1}
acide protocatéchique	0, 5	84 ± 3	12.900 ± 500
phloroglucine	0, 6	0	0

4.3.1.5. Aromadendrine.

Obtenu : 0, 7 mg

Spectre U.V. : max. 292 m μ .

Réaction colorée : $\text{Zn} + \text{HCl}$: rose rouge.

Radioactivité : $725 \pm 20 \text{ cpm mg}^{-1}$, $208.000 \pm 6.000 \text{ cpm mM}^{-1}$.

dilution par rapport à l'acide cinnamique : $\delta = 1.200$.

- Oxydation en kaempférol

0, 5 mg d'aromadendrine radioactive et 9, 5 mg d'aromadendrine inerte ($\rho = 1/20$) donnent, par oxydation avec NaSO_3H , 5, 5 mg de kaempférol cristallisés dans l'éthanol.

Radioactivité : $36 \pm 1 \text{ cpm mg}^{-1}$, $10.300 \pm 300 \text{ cpm mM}^{-1}$,

soit, en tenant compte de la dilution : $206.000 \pm 6.000 \text{ cpm mM}^{-1}$.

- Fusion alcaline du kaempférol.

La fusion alcaline sur 4 mg de kaempférol radioactif donne :

	poids en mg	radioactivité	
		cpm mg^{-1}	cpm mM^{-1}
ac. parahydroxybenzoïque	0,8	76 ± 3	10.500 ± 400
phloroglucine	0,7	0	0

4.3.1.6. Naringénine.

Quantité obtenue : 0,2 mg

Spectre U.V. dans l'alcool : max. 290 m μ , inflexion à 223 m μ

Radioactivité : 1250 ± 50 cpm mg^{-1} , 340.000 ± 13.600 cpm mM^{-1} .

Dilution par rapport à l'acide cinnamique : $\delta = 730$.

0,1 mg de naringénine radioactive et 10 mg de naringénine inerte ($\rho = 1/100$) sont cristallisés dans 2 ml d'éthanol. 4 mg de naringénine sont obtenus :

Radioactivité : 11 ± 1 cpm mg^{-1} , 3.000 ± 270 cpm mM^{-1} ,

soit, en tenant compte du facteur de dilution :

300.000 ± 27.000 cpm mM^{-1} .

- Fusion alcaline de la naringénine.

La microfusion effectuée sur 3 mg de naringénine n'a pas permis d'identifier l'acide parahydroxy-benzoïque ; la phloroglucine était en quantité trop faible, $\approx 0,02$ mg, pour pouvoir être dosée correctement.

4.4. Expérience faite avec l'acide phényl-pyruvique ^{14}C - 3.

12 mg de phényl-pyruvate de potassium (As 250 $\mu\text{C}/\text{mM}$), dissous dans 10 ml d'eau, sont administrés à l'extrémité de la deuxième branche (longueur 1,5m) du Prunus Mahaleb utilisé précédemment pour le cinnamate, le 1er Mai 1964.

58 jours après l'injection, la branche est coupée. La radioactivité décelable avec le compteur Geiger portatif (fenêtre épaisseur 1,7 mg/cm 2) s'étale sur une longueur de 45 cm à partir du point d'injection. Seule cette partie sera traitée (Poids : 58 g. Poids de l'extrait sec : 2,4 g).

Le protocole expérimental décrit pour l'acide cinnamique a été repris ici. Les résultats sont groupés dans le tableau ci-après 22.

Tableau n° 22

	quantité obtenue en mg	Radioactivité		dilution δ par rapport à l'acide phényl- pyruvique	quantité de substance inerte ajoutée en mg	dilution ρ	Radioactivité du produit dilué	
		cpm mg^{-1}	cpm mM^{-1}				cpm mg^{-1}	cpm mM^{-1}
glucosyl-7 taxifoline ↓ oxydation glucosyl-7 quercétine ↓ hydroluyse quercétine ↓ fusion acide protocatéchique phloroglucine	2,5 2 0,5 1 1,2	79 $\pm$ 3 78 $\pm$ 3 	38000 $\pm$ 1100 37100 $\pm$ 1100 * 36200 $\pm$ 360 	66000	10	1/20	6 $\pm$ 0,5 radioactif 0	1810 $\pm$ 180
glucosyl-7 aromadendrine ↓ oxydation glucosyl-7 kaempférol ↓ hydrolyse kaempférol ↓ fusion ac. p. hydroxy-benzoïque + phloroglucine	0,8 2 0,8 0,5 0,6	158 $\pm$ 5 	* 73000 $\pm$ 2200 72400 $\pm$ 3200 * 72000 $\pm$ 3600 * 73600 $\pm$ 7300 * 70400 $\pm$ 3600	34000	5,6 24	1/8 1/8 1/8 x 1/4 1/32	20 $\pm$ 1 19,6 $\pm$ 1 8 $\pm$ 0,5 16 $\pm$ 1 0	9200 $\pm$ 400 9000 $\pm$ 450 2300 $\pm$ 230 2200 $\pm$ 120 0
prunine ↓ hydrolyse naringénine + glucose ↓ fusion naringénine radioactive 0,5 + 5 mg naringénine inerte ac. p. hydroxy-benzoïque + phloroglucine	2,7 1 1,2	 	* 191000 $\pm$ 55000 	1300	12	1/5,45 1/5,45 puis 1/11	78 $\pm$ 2 134 $\pm$ 4 env. 1 23 $\pm$ 1 0	35000 $\pm$ 1000 36400 $\pm$ 1000 3200 $\pm$ 160 av. dilut. 1/11 * 34200 $\pm$ 1800 0
Taxifoline ↓ fusion taxifoline radioactive 1,8 mg inerte 3,6 mg acide protocatéchique + phloroglucine	2,1 0,5 0,6	100 $\pm$ 3 	30400 $\pm$ 1000 * 30000 $\pm$ 900 *	82000		1/3 1/3	65 $\pm$ 2 	10000 $\pm$ 300
aromadendrine ↓ fusion aromadendrine radioactive 1 inerte 5 ac. p. hydroxy-benzoïque + phloroglucine	1,8 0,8 0,7	256 $\pm$ 7 	73500 $\pm$ 2100 * 73800 $\pm$ 2400	34000		1/6 1/6	89 $\pm$ 2 0	12300 $\pm$ 400 0
naringénine	spectre U.V. non correct, activité non déterminée.							

(*) Activité spécifique moléculaire déterminée en tenant compte de la dilution.

(Poids : 58 g. Poids de l'extrait sec : 2,4 g).

Le protocole expérimental décrit pour l'acide cinnamique a été repris ici.
Les résultats sont groupés dans le tableau ci-après 22.

D'après ces résultats, l'acide phényl-pyruvique $^{14}\text{C} - 3$ s'incorpore dans les flavanones, flavanonols ou dans leurs glucosides, chez Prunus Mahaleb. L'atome radioactif se trouve localisé en position 2 comme le montrent les fusions alcalines.

L'acide phényl-pyruvique est moins bien incorporé que l'acide cinnamique dans les flavonoïdes (Tableau 23).

Tableau n° 23

Composés	As de l'ac. cinnamique As du composé	As de l'ac. phényl-pyruvique As du composé
glucosyl-7 taxifoline	166	66 000
glucosyl-7 aromadendrine	170	34 000
prunine	272	1 300
taxifoline	1 850	82 000
aromadendrine	1 200	34 000
naringénine	730	-

5. ETUDE CINETIQUE DE L'INCORPORATION DE L'ACIDE TRANS CINNAMIQUE $^{14}\text{C} - 3$ DANS LES COMPOSES FLAVONIQUES DE PRUNUS MAHALEB.

5.1. Injection.

Sur le même Prunus Mahaleb qui a été utilisé dans les deux expériences précédentes, deux autres branches A et B (longueur 1, 30-1, 55 m) ont été traitées.

A la branche A, 12 mg de cinnamate de K ($\text{As } 250 \mu\text{C mM}^{-1}$), dissous dans 10 ml d'eau, ont été injectés le 1er Mai. La branche a été coupée 2 jours après l'injection. La radioactivité décelable avec le compteur Geiger portatif s'étendait sur une longueur de 35 cm, à partir de l'extrémité où l'injection a été faite. Seule, cette portion de branche a été traitée.

A la branche B, 15 mg de cinnamate de K ($As\ 250\ \mu\ c\ mM^{-1}$), dissous dans 10 ml d'eau, ont été injectés le 1er mai. La branche B a été coupée 17 jours après l'injection. La radioactivité a été détectée sur une longueur de 50 cm à partir de l'extrémité injectée. Seule cette portion de la branche B a été traitée.

5.2. Etude des composés

Les composés flavoniques relatifs à la branche C ont été étudiés en détail dans l'expérience précédente.

Les mêmes composés ont été étudiés pour les branches A et B, en utilisant la même technique de fractionnement que celle décrite pour la branche C. La pureté chimique des composés a été vérifiée par spectrométrie U.V. et par chromatographie.

Aucune dégradation n'a été faite sur ces composés.

Les résultats figurent dans le tableau 24

Tableau n° 24

Composés	branche	Quantité obtenue en mg	Radioactivité		Dilution δ par rapport à l'ac. cinnamique.
			cpm mg^{-1}	cpm mM^{-1}	
Glucosyl-7 Taxifoline	A	2,2	740 $\pm$ 10	350000 $\pm$ 3600	715
	B	3	1520 $\pm$ 20	725000 $\pm$ 7300	345
Glucosyl-7 aromadendrine	A	2,1	3350 $\pm$ 40	1550000 $\pm$ 16000	161
	B	1,2	9100 $\pm$ 100	4200000 $\pm$ 50000	60
prunine	A	2,1	1860 $\pm$ 20	830000 $\pm$ 8400	300
	B	3,1	3150 $\pm$ 150	1400000 $\pm$ 22000	178
Taxifoline	A	0,2	700 $\pm$ 10	210000 $\pm$ 2100	1200
	B	0,9	400 $\pm$ 8	191000 $\pm$ 2000	1300
Aromadendrine	A	0,3	1050 $\pm$ 10	300000 $\pm$ 3000	830
	B	0,8	1080 $\pm$ 10	310000 $\pm$ 3000	810
Naringénine	A	0,3	1270 $\pm$ 15	345000 $\pm$ 3600	725
	B	0,7	1030 $\pm$ 10	280000 $\pm$ 3000	900

CONCLUSIONS GENERALES

1/ La première partie de notre exposé fait le point :

- des différentes hypothèses formulées sur la biogénèse des composés flavoniques,
- des travaux expérimentaux in vitro et in vivo réalisés pour infirmer ou rejeter ces hypothèses.

De cette étude, il ressort :

a) qu'aucun essai précis d'incorporation d'unités C_6-C_3 n'a été fait dans les flavanones et dans les flavanonols.

b) que l'existence d'un intermédiaire, du type chalcone, dans la chaîne métabolique conduisant aux dérivés flavoniques peut être envisagée mais que l'importance primordiale accordée à ces composés reste encore à vérifier. Les chalcones peuvent en effet donner naissance par exemple aux flavanonols par la voie



mais l'existence d'un autre type de filiation est également possible.

c) que l'étape d'hydroxylation du noyau C n'est pas encore déterminée avec certitude. Cette oxydation peut s'effectuer aux stades des unités C_6-C_3 ou $C_6-C_3-C_6$ ou benzo-pyranique.

d) que l'ordre de formation des aglycones et des glucosides n'a pas été établi.

2/ En vue d'entreprendre les recherches envisagées sur Prunus avium, Robinia pseudoacacia et Prunus Mahaleb, nous avons fait, dans un premier temps, le recensement des flavonoïdes présents dans ces espèces et, dans un deuxième temps, nous avons mis au point une méthode d'isolement et d'identification pour chaque pigment flavonique.

a) De la poudre de bois de Prunus avium, nous avons isolé 12 composés flavoniques et en avons identifié 4 :

- la tectochrysine,
- la dihydrotectochrysine,
- la trihydroxy-4, 2', 6' méthoxy-4' chalcone,
- la sakuranétine.

Nous avons contribué à l'étude de la structure d'un nouveau composé flavonique : la dihydrowogonine.

b) Nous avons décrit :

- une méthode simple d'isolement de la dihydrorobinétine, de la robtine et du tétrahydroxy-7, 3', 4', 5' flavanediol, à partir de la poudre de cœur de Robinia pseudoacacia.

- une méthode d'isolement et d'identification des glucosides de flavanones, des glucosides de flavanonols, des flavanones et flavanonols de la poudre de bois de Prunus Mahaleb.

3/ En utilisant au lieu des aldéhydes libres leur combinaison bisulfite, nous avons décrit la synthèse des acides cinnamique, phényl-pyruvique et chalcones marqués.

Cette méthode a l'avantage de permettre une purification facile et d'assurer une conservation prolongée de l'aldéhyde radioactif. Le fait que ces combinaisons bisulfite soient solides facilite aussi leur manipulation, dans le cas de composés radioactifs.

Différentes réactions peuvent être effectuées en utilisant directement cette combinaison, sans diminution sensible du rendement.

4/ a) Nous avons montré que l'acide trans cinnamique ^{14}C - 3 s'incorpore dans les flavanones et flavanonols suivants :

- la dihydrorobinétine et la robtine, chez Robinia pseudoacacia,
- l'aromadendrine et la naringénine, chez Prunus avium,
- la taxifoline, la glucosyl-7 taxifoline, l'aromadendrine, la glucosyl-7 aromadendrine, la naringénine et la prunine chez Prunus Mahaleb

Cette incorporation semble assez générale :

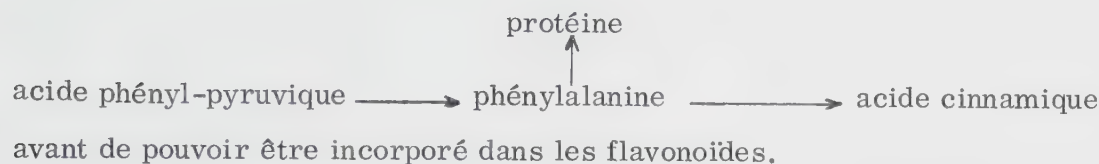
- indépendante du noyau A (type résorcinol ou phloroglucinol),

- indépendante de l'espèce (l'aromadendrine et la naringénine deviennent radioactives chez Prunus avium et Prunus Mahaleb).

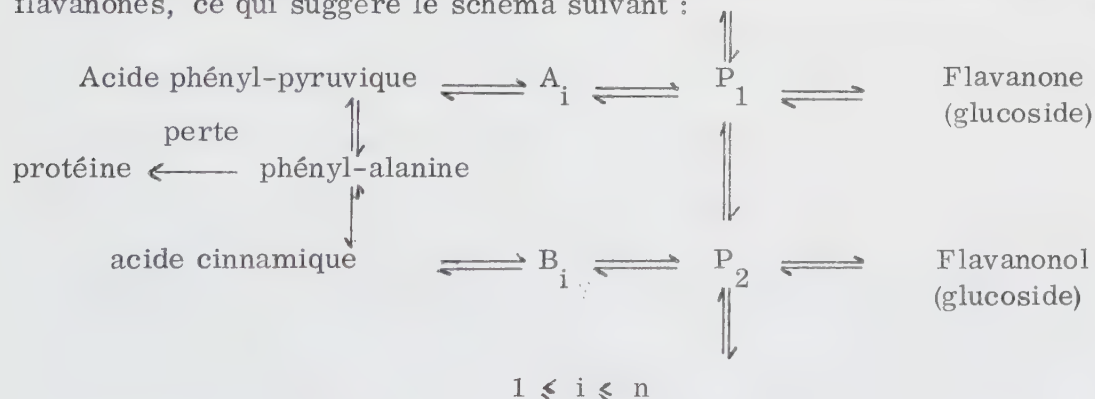
L'incorporation de l'acide cinnamique dans les glucosides de flavanols semble très élevée (1,7 % dans le cas de la glucosyl-7 aromadendrine).

Nous avons montré que l'atome radioactif, dans toutes ces molécules était localisé en 2, résultat confirmant les hypothèses biogénétiques admises.

b) Nous avons montré que l'acide phényl-pyruvique $^{14}\text{C} - 3$ s'incorpore également dans les composés flavoniques de Prunus Mahaleb, mais cette incorporation est moins bonne que celle obtenue en administrant l'acide cinnamique $^{14}\text{C} - 3$. Il semble, de ce fait, que l'acide phényl-pyruvique doit suivre la voie classique :



Cependant, les rapports d'incorporation de l'acide phényl-pyruvique dans les flavanones et flavanols ne correspondent pas avec ceux observés dans le cas de l'acide cinnamique. Ainsi, l'acide phényl-pyruvique serait plus directement utilisable pour la biosynthèse des flavanones que des flavanols ; alors que l'acide cinnamique semble un précurseur plus proche des flavanols que des flavanones, ce qui suggère le schéma suivant :

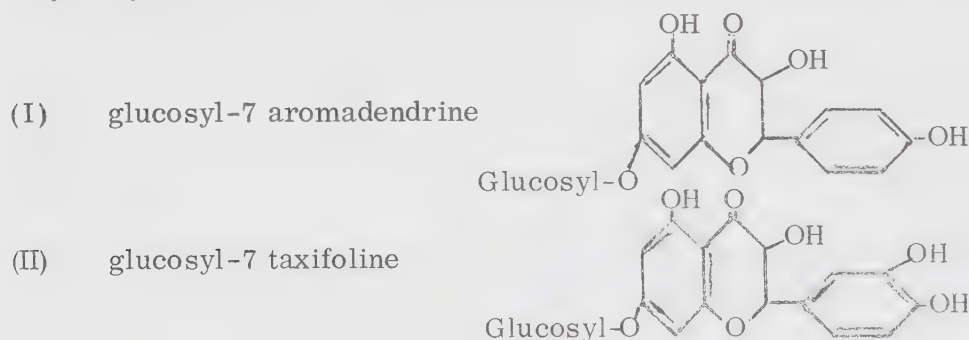


c) Une étude cinétique d'incorporation de l'acide trans cinnamique $^{14}\text{C} - 3$, en fonction du temps, dans les composés flavoniques de Prunus Mahaleb nous a permis de dégager les faits suivants :

- L'évolution comparée des activités spécifiques moléculaires de la prunine ou glucosyl-7 naringénine (flavanone) et de la glucosyl-7 aromadendrine (flavanonol) permet d'exclure la possibilité d'une hydroxylation en 3 dans ce cas ; il nous faut donc envisager une transformation hypothétique du glucoside de chalcone (P_1) en glucoside de flavanonol, excluant comme intermédiaire le glucoside de flavanone. Nous pouvons penser à un composé de type glucoside d'époxy-chalcone comme métabolite (P_2). Dans le schéma, ci-dessus, les composés tels que A_1 , B_1 représentent des intermédiaires existant entre les acides C_6-C_3 et les composés de la famille P. Par exemple, ils peuvent être du type : cinnamoyl SCoA (B_1), cinnamoyl acétyl (ou malonyl) SCoA (B_2) etc...

- Les activités spécifiques moléculaires des aglycones (naringénine, aromadendrine, taxifoline) sont toujours très inférieures à celles de leur glucoside en 7 correspondant (prunine, glucosyl-7 aromadendrine, glucosyl-7 taxifoline). Ce résultat confirmerait l'hypothèse avancée par PACHECO (95), suivant laquelle les glucosides pourraient donner, après élimination du reste glucosyle par une glucosidase, les aglycones.

- En comparant, chez Prunus Mahaleb, les courbes d'évolution des activités spécifiques moléculaires des glucosides de deux flavanonols (I et II) dont le degré d'hydroxylation du noyau latéral est différent :



on voit que l'activité spécifique moléculaire de (II) augmente proportionnellement à la diminution de l'activité spécifique moléculaire de (I). Le glucoside d'aromadendrine peut donc constituer un précurseur du glucoside de taxifoline. Cette transformation s'effectue sans doute par une hydroxylation enzymatique du noyau latéral, sans dégradation intermédiaire importante, puisque la somme des activités de ces deux composés reste sensiblement constante en fonction du temps.

B I B L I O G R A P H I E

- (1) ALGAR J. et FLYNN J.P., Proc. Roy. Irish Acad., 1934, 42 B, 1.
- (2) BACHARACH G. et BROGAN F., J. amer. chem. Soc., 1928, 50, 3333-4.
- (3) BARBER G.A., Biochem. biophys. Res. Comm., 1962, 8, 204-8.
- (4) BARNOUD F., HIGUCHI T., JOSELEAU J.P. et MOLLARD A., C.R. Acad. Sci., 1964, 259, 4339-41.
- (5) BEALE G.H., ROBINSON G.M., ROBINSON R. et SCOTT-MONCRIEFF R., J. Genetics, 1939, 37, 375.
- (6) BILLECK G. et HERMANN E.F., Monatsh. Chem., 1959, 90, 89-95.
- (7) BIRCH A.J., Biosynthesis of Flavonoids and Anthocyanins, in The Chemistry of Flavonoid Compounds, GEISSMAN T.A., Pergamon Press, 1962, 618-25.
- (8) BIRCH A.J. et DONOVAN F.W. Austral. J. Chem., 1953, 6, 360-8.
- (9) BOGORAD L. The Biogenesis of Flavonoids, in Annual Review of Plant Physiology, 1958, 9, 417-48.
- (10) BOUDET A., Thèse Docteur de spécialité (Biologie végétale : Enzymologie et métabolisme), Université de Toulouse, juin 1965.
- (11) BRANSON H., Arch. Biochem. Biophys., 1952, 36, 48-59.
- (12) BRANSON H., Arch. Biochem. Biophys., 1952, 36, 60-70.
- (13) BRASS K. et KRANZ H., Ann. der Chem., 1932, 499, 175.
- (14) BROWN S.A. et NEISH A.C., Canad. J. Biochem. Physiol., 1955, 33, 948-62.
- (15) CALVIN M., Isotopic Carbon, John Wiley & Sons Ed., 1949, 180.
- (16) CALVIN M., Isotopic Carbon, John Wiley & Sons Ed., 1949, 197-99.
- (17) CHADENSON M., MOLHO-LACROIX L., MOLHO D. et MENTZER C., C. R. Acad. Sci., 1955, 240, 1362-4 ; CHADENSON M., Thèse Doctorat ès Sciences physiques, Université de Lyon, 8 juillet 1961.
- (18) CHERONIS N.D. Micro and Semimicro Methods, Interscience publishers, 1954, 6, 248-50 et 281.
- (19) CHOPIN J., DURUAL P. et CHADENSON M., Bull. Soc. chim., 1965, 3572-7.
- (20) CHOPIN J. MOLHO D., PACHECO H. et MENTZER C., Bull. Soc. chim., 1957, 192-204.
- (21) CHOPIN J. et PACHECO H., Bull. Soc. Chim. biol., 1958, 40, 1593-601.
- (22) COILLARD J., PACHECO H., MOLHO D. et MENTZER C., C. R. Acad. Sci., 1954, 238, 1890-2, COILLARD J., Thèse Docteur de l'Université de Lyon, 17 déc. 1955.
- (23) COMTE P., Thèse Docteur de l'Université de Lyon, 6 déc. 1958.
- (24) COMTE P., VILLE A., ZWINGELSTEIN G., FAVRE-BONVIN J. et MENTZER C., Bull. Soc. Chim. biol., 1958, 40, 1117-31.

- (25) COMTE P., VILLE A., ZWINGELSTEIN G., FAVRE-BONVIN J. et MENTZER C., Bull. Soc. chim. biol., 1960, 42, 1079-90.
- (26) CURTIN D.Y., FLYNN E.W. et NYSTROM R.F., J. amer. chem. Soc., 1958, 80, 4599-601.
- (27) DIPPY J.F.J. et EVANS R.M., J. org. Chem., 1950, 15, 451-6.
- (28) DIPPY J.F.J. et PARKINS J.C., J. org. Chem., 1951, 16, 1573.
- (29) DOEBNER O., Ber., 1902, 35, 1136.
- (30) DURUAL P., Thèse Docteur-Ingénieur, Université de Lyon, 11 déc. 1964.
- (31) FITTIG R., Ber., 1883, 16, 1436-8.
- (32) FLORENCE G., Bull. Soc. chim., 1927, 41, 440-4.
- (33) FREUDENBERG K. et HARTMANN L., Ann. der Chem., 1954, 587, 207.
- (34) FUJIWARA K. et NARUSE K., Chem. Abstr., 1963, 59, 2695h ; Nippon Kagaku Zasshi, 1961, 82, 1400.
- (35) GEISSMAN T.A., The Chemistry of Flavonoid Compounds, Pergamon Press, 1962.
- (36) GEISSMAN T.A. et HARBORNE J.B., Arch. Biochem. Biophys., 1955, 55, 447.
- (37) GEISSMAN T.A. et HINREINER E., Bot. Rev., 1952, 18, 77.
- (38) GEISSMAN T.A. et SWAIN T., Chem. and Ind., 1957, 984.
- (39) GIBSON M.I. et GIBSON F., Biochem. J., 1964, 90, 248-56.
- (40) GORIZDRA M.I. et BARANOV S.N., Chem. Abstr., 1957, 51, 8069c ; Zhur. Obshechi Khim., 1956, 26, 3092.
- (41) GRISEBACH H., Etude de la biosynthèse de la cyanidine à l'aide de composés marqués au ¹⁴C., Conf. internationale sur l'utilisation des radioisotopes. UNESCO Paris, 1957. Z. Naturforsch., 1957, 12b, 227-31.
- (42) GRISEBACH H., Die Biosynthese der Anthocyane IV. Internationaler Kongress für Biochimie, Wien 1-6 sept. 1958. Vorabdruck Nr. 7, 1-14.
- (43) GRISEBACH H., Z. Naturforsch., 1958, 13b, 335-6.
- (44) GRISEBACH H., Z. Naturforsch., 1959, 14b, 802-9.
Chemistry of Natural and Synthetic colouring matters and related Fields, Dedicated to Professor K. VENKATARAMAN in commemoration of his 60 th birthday, Academic Press, Ed.
- (45) GRISEBACH H., The Biosynthesis of isoflavones, in Recent Developments in the Chemistry of Natural Phenolic Compounds, Ollis W.D., Pergamon Press, 1961, 59-73.
- (46) GRISEBACH H., Planta Medica, 1962, 387.
- (47) GRISEBACH H., Biosynthesis of Flavonoids, in Chemistry and Biochemistry of Plant Pigment, Goodwin T.W., Academic Press Ed., 1965, 279-308.
- (48) GRISEBACH H. et BOPP M., Z. Naturforsch., 1959, 14b, 485-90.
- (49) GRISEBACH H. et BRANDNER G., Biochem. biophys. Acta, 1962, 60, 51-7 ; Experientia, 1962, 18, 400.

- (50) GRISEBACH H. et DOERR N., Z. Naturforsch., 1959, 15b, 284.
- (51) GRISEBACH H. et KELLNER S., Z. Naturforsch., 1965, 20b, 446-50.
- (52) GRISEBACH H. et PATSCHKE L., Chem. Ber., 1960, 93, 2326-9.
- (53) GRISEBACH H. et PATSCHKE L., Z. Naturforsch., 1961, 16b, 645.
- (54) GRISEBACH H. et PATSCHKE L., Z. Naturforsch., 1962, 17b, 875.
- (55) GRISEBACH H. et PATSCHKE L., Chem. Ber., 1962, 95, 2098-9.
- (56) GRISEBACH H. et PATSCHKE L., (1963 non publié) in Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, Goodwin T.W., Academic Press Ed., 1965, 284.
- (57) GRÖGER T. et WALDMANN E., Monatsch. Chem., 1958, 89, 370-6.
- (58) GROUILLER A., Thèse Docteur ès Sciences physiques, Université de Lyon, 15 juillet 1965.
- (59) GURIN S. et DELLUVA A.M., J. biol. Chem., 1947, 170, 545-50.
- (60) HARBORNE J.B., Phytochemistry, 1963, 2, 85-7.
- (61) HASEGAWA M., J. amer. chem. Soc., 1957, 79, 1738-40.
- (62) HATTORI S., Chem. Zbl., 1926, I, 955.
- (63) HERBST R.M. et SHEMIN D., Synthèses organiques, Masson, Paris, 1949, Vol. II, 93.
- (64) HERGET H.L. et GOLDSCHMID O., J. org. Chem., 1958, 23, 700.
- (65) HIGUCHI T., BARNOUD F. et ROBERT A., Ass. technique de l'industrie papetière, 1964, 18, 92-106.
- (66) HILLIS W.E. et ISOI K., Phytochemistry, 1965, 4, 905-18.
- (67) HORIGUCHI H., Chem. Abstr., 1954, 48, 9956h ; Repts. Govt. Chem. Ind. Research Inst. Tokyo, 1962, 47, 165-9.
- (68) JURD L., Spectral Properties of Flavonoid Compounds, in the Chemistry of Flavonoid Compounds, GEISSMAN T.A., Pergamon Press, 1962, 112.
- (69) KALNIN P., Helv. chem. Acta, 1928, 11, 977-1003.
- (70) KARRER W., Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe, Birkhäuser Verlag, Basel, 1958.
- (71) KENNEDY E.P., Ann. Rev. Biochem., 1957, 26, 119.
- (72) KNOEVENAGEL E., Ber., 1898, 31, 2596-619.
- (73) KOUKOL J. et CONN E.E., J. biol. Chem., 1961, 236, 2692.
- (74) KRATZL K. et BILLEK G., Monatsh. Chem. 1954, 85, 845-55.
- (75) LAWRENCE W.J.C. et PRICE J.R., Biol. Revs, 1940, 15, 35-58.
- (76) LEBRETON P., Thèse Docteur ès Sciences naturelles, Université de Lyon, 6 oct. 1962.
- (77) LYNEN F. et TADA M., Angew. Chem., 1961, 73, 513-9.
- (78) MARSH C.A., Biochem. biophys. Acta, 1960, 44, 359-61.
- (79) MASSICOT J., MENTZER C. et PILLON D., C. R. Acad. Sci., 1954, 238, 111-2.

- (80) MAURICE A. et MENTZER C., Bull. Soc. Chim. biol., 1954, 36, 369-72.
- (81) MENTZER C., Conférence du Centre de Perfectionnement Technique, Presse Documentaire, Paris, Fasc. n° 2907, 1-19.
- (82) MENTZER C. et FATIANOFF O., Actualités de Phytochimie fondamentale, Masson Ed., Paris, 1964, 93.
- (83) MENTZER C. et PACHECO H., Bull. Soc. Chim. biol., 1952, 34, 576-85.
- (84) MENTZER C. et PACHECO H. Bull. Soc. Chim. biol., 1952, 34, 956-62.
- (85) MENTZER C., PACHECO H. et VILLE A., Bull. Soc. Chim. biol., 1954, 36, 1137-50.
- (86) MIKLUKHIN G.P., Chem. Abstr., 1951, 45, 545c ; Doklady Akad. Nauk. S.S.S.R., 1950, 73, 117-20.
- (87) MITSUHASHI H., KANEKO K., et SASAKI M., Chem. Pharmac. Bull., 1962, 10, 1119-22.
- (88) MURAKAMI M. et IRIE T., Proc. Imp. Acad. Tokyo, 1935, 11, 229-31.
- (89) NEISH A.C., Biosynthetic Pathways of Aromatic Compounds, in Annual Review of Plant Physiology , 1960, 11, 55-80.
- (90) ONSLOV N.W., The Anthocyanin Pigments of Plants, 2ème Ed., Cambridge, University Press, 1925 ; Nature, 1931, 128, 373-4.
- (91) OYAMADA T., J. Chem. Soc. Japan, 1934, 55, 1256-61.
- (92) PACHECO H., Bull. Soc. chim., 1956, 1600-4.
- (93) PACHECO H., Bull. Soc. Chim. biol., 1957, 39, 971-87.
- (94) PACHECO H., Bull. Soc. Chim. biol., 1959, 41, 111-7.
- (95) PACHECO H., C. R. Acad. Sci., 1960, 251, 1077-9.
- (96) PACHECO H., C. R. Acad. Sci., 1960, 251, 1653-4.
- (97) PACHECO H., Communication personnelle.
- (98) PACHECO H. et BRACHET A.M., C.R. Acad. Sci., 1960, 250, 1106-7.
- (99) PACHECO H. et CHADENSON M., C.R. Acad. Sci., 1956, 242, 1621-4.
- (100) PACHECO H. CRONENBERGER L. et MENTZER C., Bull. Soc. Chim. biol., 1957, 39, 439.
- (101) PACHECO H. et GROUILLER A., C.R. Acad. Sci., 1961, 253, 1178-9.
- (102) PANDYA K.C. et PANDYA R.B., Chem. Abstr. 1942, 36, 1599², Proc. Indian Acad. Sci., 1949, 14A, 112-22.
- (103) PATSCHKE L. et GRISEBACH H., Z. Naturforsch., 1962, 17b, 857-8.
- (104) PATSCHKE L. et GRISEBACH H., Z. Naturforsch., 1965, 20b, 399.
- (105) PATSCHKE L., HESS D. et GRISEBACH H., Z. Naturforsch., 1964, 19b, 1114-7.
- (106) PERKIN W.H., J. chem. Soc., 1877, 31, 388-427.
- (107) PILLON D. et MENTZER C., Bull. Soc. chim., 1954, 21 (5), 30-3.
- (108) PLIENINGER H. et WEST G., Chem. Ber., 1955, 88, 1956-61.

- (109) PRIDHAM J.B., Low Molecular Weight Phenols in Higher Plants, in Annual Review of Plant Physiology, 1965, 16, 13-36.
- (110) REICHEL L. et STEUDEL J., Ann. der Chem., 1942, 553, 83-97.
- (111) REINER J.M., Arch. Biochem. Biophys., 1953, 46, 54-79.
- (112) REZNIK H. et URBAN R., Naturwissenschaften, 1957, 44, 13 et 592-3.
- (113) RICHARDS R.W., The Biosynthesis of Phenolic Compounds from activated Acetic acid Units, in Recent Developments in the Chemistry of Natural Phenolic Compounds, Ollis W.D., Pergamon Press, Ed., 1961, 1-19.
- (114) ROBINSON R., Nature, 1936, 137, 172.
- (115) ROJAHN C.A. et SCHULTEN J., Ber., 1926, 59, 499-501.
- (116) ROUX D.G., Communication personnelle.
- (117) ROUX D.G. et PAULUS E., Biochem. J., 1962, 82, 324-30.
- (118) SCHMID K. et PIETSCH K., Monatsh. Chem., 1931, 57, 305.
- (119) SCHMIDT H., Biosynthese phenolischer Pflanzeninhaltsstoffe, Die Pharmacie, 1963, 445-56.
- (120) SCIPIONI A., Chem. Abstr., 1952, 46, 8635a ; Ann. Chim. (Rome), 1951, 41, 697-704.
- (121) SCOTT-MONCRIEFF R., Ergeb. Enzymforsch., 1939, 8, 277-306.
- (122) SCOTT-MONCRIEFF R., J. Genetics, 1939, 37, 375.
- (123) SESHADRI T.R., Colloque sur les Hétérocycles oxygénés, C.N.R.S., 1955, 71.
- (124) SHIMOKORIYAMA M., The Chemistry of Flavonoids Compounds, GEISSMAN T.A., Pergamon Press Ed., 1962, 289.
- (125) SUKHOV G.V., The Use of Radiocarbon in the Biosynthesis of Terpenes, Conf. internationale sur l'utilisation des radioisotopes, UNESCO, Paris, 1957.
- (126) SURREY A.R., Name Reactions in Organic Chemistry, 2ème éd., Academic Press Ed., 1961, 52-3.
- (127) SURREY A.R., Name Reactions in Organic Chemistry, 2ème éd., Academic Press Ed., 1961, 92-4.
- (128) SURREY A.R., Name Reactions in Organic Chemistry, 2ème éd., Academic Press Ed., 1961; 147-9.
- (129) TUPITSYN I.F. et SEMENOVA N.K., Chem. Abstr., 1962, 56, 1380 g ; Trudy Gorridarnt. Inst. Priklad. Khim., 1960, 45, 25-32.
- (130) UNDERHILL E.W., WATKIN J.E. et NEISH A.C., Canad. J. Biochem. Physiol., 1957, 35, 219-28.
- (131) VILLE A., COMTE P., ZWINGELSTEIN G. et FAVRE-BONVIN J., Bull. Soc. chim., 1958, 1352-5.
- (132) VILLE A. et PACHECO H., C.R. Acad. Sci., 1964, 258, 312-4.
- (133) VILLE A. et PACHECO H., C.R. Acad. Sci., 1964, 258, 3110-2.
- (134) VILLE A., Mme VILLE R. et PACHECO H., C.R. Acad. Sci., 1965, 260, 206-8.

- (135) VILLE A. et PACHECO H., C.R. Acad. Sci., 1965, 261, 753-5.
- (136) WAKIL S.J., J. amer. chem. Soc., 1961, 81, 2597.
WAKIL S.J., PUGH E.L., et SAUER F., Biochemistry, 1964, 52, 106-14.
- (137) WATKIN J.E., UNDERHILL E.W. et NEISH A.C., Canad. J. Biochem. Physiol., 1957, 35, 229-37.
- (138) WEHRMEISTER H.L., J. org. Chem., 1962, 27, 4418-20.
- (139) WEYGAND F., STEGLICH W. et TANNER H., Ann. der Chem., 1962, 658, 128-50.
- (140) WHALLEY W.B., Chem. and Ind., 1956, 1049-50.
- (141) WONG E., Chem. and Ind., 1964, 1985-6.
- (142) WONG E., MORTIMER P.I. et GEISSMAN T.A., Phytochemistry, 1965, 4, 89-95.
- (143) WRIGHT D., BROWN S.A. et NEISH A.C., Canad. J. Biochem. Physiol., 1958, 36, 1037-45.
- (144) YUR'EV Y.K., ELYAKOV G.B. et VYSOKOSOV A.N., Chem. Abstr., 1956, 50, 14638d,
Zhur. Obshchei Khim., 1956, 26, 926-30.
- (145) ZAPROMETOV M.N., Conceptions modernes sur la biosynthèse des composés aromatiques, Usp.
bio. Khim. S.S.S.R., 1964, 6, 264-303.
- (146) ZILVERSMIT D.B., ENTENAM C. et FISHLER M.C., J. Gen. Physiol., 1943, 26, 325-31.
- (147) ZUFFANTI S. et SARDILLA J.J., J. amer. chem. Soc., 1950, 72, 4322-3.

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

APPORT DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE
A LA STRUCTURE DES OSES.

Vu :

Les membres du Jury :

MM. J. COLONGE Président

J. CHOPIN

H. PACHECO Examineurs

C. MENTZER

Vu et approuvé :

Le Doyen de la
Faculté des Sciences

J. BRACONNIER

Vu et accordé le permis d'imprimer :

Lyon, le 23 avril 1966

Le Recteur,

Président du Conseil de l'Université

P. LOUIS

LMD

99, Av. de Saxe, LYON

Dépôt Légal - Juin 1966

